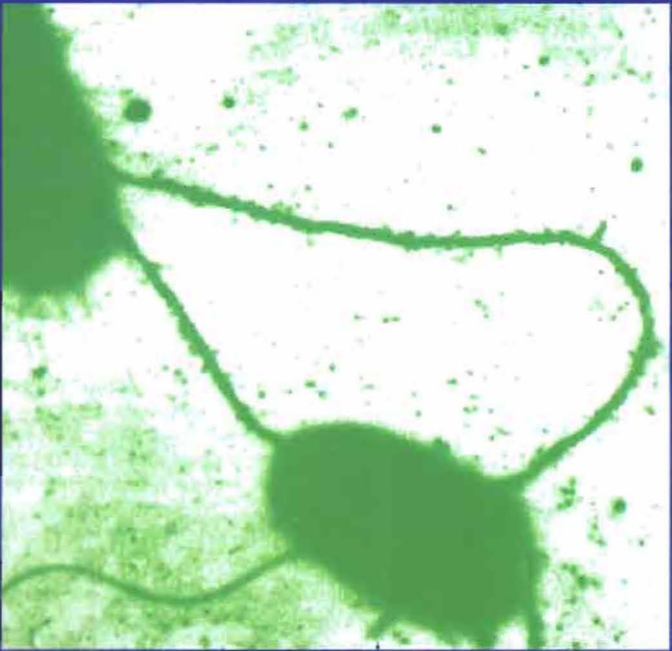
MICROBIOLOGÍA GENERAL

Hans G. Schlegel

En colaboración con Christiane Zaborosch



Nueva edición

OMEGA

VISIT…

LANZAROTE
Caliente.com

K-612 4'504

MICROBIOLOGÍA GENERAL

Hans G. Schlegel

En colaboración con Christiane Zaborosch

263 ilustraciones y 41 tablas

Traducido por

jordi Lalucat

Catedrático de Microbiología
Universitat de les Illes Balears

Nueva edición

EDICIONES OMEGA, S.A.
Plató, 26 - 08006 Barcelona 1997

Prof. DI. Hans-Günter Schlegel
Institut für Mikrobiologie del' Universität Góttingen

Dr. Christiane Zaborosch
Institut für Mikrobiologie del' Universitat Góttingen

La edición original de esta obra ha sido publicada en alemán por la editorial George Thieme Verlag de Stuttgart, con el título

ALLGEMEINE MIKROBIOLOGIE

Diseño de la cubierta
Cèlia Valles

Quedan rigurosamente prohibidas, sin la autorización escrita de los titulares del "Copyright", bajo las sanciones establecidas en las leyes, la reproducción total o parcial de esta obra por cualquier medio o procedimiento, comprendidos la reprografía y el tratamiento informático, y la distribución de ejemplares de ella mediante alquiler o préstamo públicos, así como la exportación e importación de esos ejemplares para su distribución en venta, fuera del ámbito de la Comunidad Económica Europea.

© 1976, 1992 Georg Thieme Verlag, Stuttgart
y para la edición española
© 1997 Ediciones Omega, S.A., Barcelona

ISBN 84-282-1030-6
Depósito legal B. 39.827-96
Printed in Spain
Ind. Gráf. Ferré O1sina, S.A. - Viladomat, 158-160 int. - 08015 Barcelona

Prefacio a la séptima edición alemana

Desde hace casi 25 años, el presente libro ha cumplido esencialmente dos funciones: ha abarcado en su contenido el campo de la Microbiología, diferenciándolo de las demás ciencias biológicas, y se ha planteado la cuestión de con qué profundidad deben tratarse los detalles en un primer contacto con la totalidad de la disciplina. La misión principal de este texto es la delimitación a lo imprescindible y la renuncia a la carga que supone todo aquello que no favorece al conocimiento general. Se ha intentado también no tener en cuenta las preponderancias impuestas por la moda, ya que muchas veces a partir de yemas invisibles aparecen ramas fructíferas. El incremento en el número de páginas se debe predominantemente a mejoras didácticas, que hacen referencia a nuevas ordenaciones de algunos capítulos, a la inclusión de nuevas figuras y a la nueva presentación de otras muchas. Las mejoras en todos los campos han requerido un gran número de inclusiones, abreviaciones y modificaciones.

Además, se han ido construyendo dos líneas de pensamiento que pueden afectar a la motivación para estudiar Microbiología. Éstas implican por una parte a la evolución de los procariotas y por otra a la Ecología de los microorganismos. La comparación de las secuencias de nucleótidos del RNA ribosómico ha proporcionado una extraordinaria visión acerca de la evolución y del árbol filogenético de los procariotas, que está en consonancia con toda una serie de datos bioquímicos. El descubrimiento de nuevas especies bacterianas, el mejor conocimiento del metabolismo y su regulación, y la necesidad de conocer mejor los procesos que tienen lugar en la biosfera (no en último término para su conservación) ha impulsado la Ecología de los microorganismos.

De nuevo debo agradecer a los estudiosos y colegas por sus críticas y sugerencias. Estoy muy agradecido por las indicaciones de errores o inexactitudes. Además de los colegas citados en la introducción de la primera edición, he recibido ayudas de las señoras Barbel Friedrich y Margot Kogut, así como de los señores Jan R. Andreesen y Botho Bowien. La señora Barbel Friedrich ha trabajado en profundidad especialmente el capítulo 15 "Genética bacteriana" y lo ha completado con nuevas aportaciones. Estoy muy agradecido a la señora Christiane Zaborosch por su ayuda en el trabajo de redacción. El libro ha sufrido también modificaciones debido a la incorporación de nuevas figuras y tablas: por ello y por el trabajo de colaboración con el señor Günter Bosch debo expresarle mi agradecimiento. Aquí puedo repetir sin ninguna limitación mi agradecimiento a la editorial Georg Thieme, ya manifestada en 1968.

Mi familia, esposa e hijos, han aprendido a convivir con la Microbiología y siempre han sido comprensivos con las prioridades ineludibles. Por ello, se lo agradezco de todo corazón.

Gottingen, julio de 1991 Hans Günter Schlegel

Prefacio a la primera edición alemana

La Microbiología trata preferentemente de los grandes grupos de hongos, bacterias y virus que presentan una variabilidad y fenómenos fisiológicos tan grandes como los objetos de disciplinas tradicionales como la Botánica o la Zoología. El estudio de los microorganismos ha brindado en los últimos años grandes aportaciones para la solución de problemas biológicos básicos. Su fácil manejo, el crecimiento rápido, la gran capacidad adaptativa y otras características han hecho de los microorganismos el objeto de estudio preferido de la Bioquímica y la Genética.

El estudioso de la Microbiología tiene a su disposición textos excelentes, indicados en la bibliografía, como la "General Microbiology" de STANIER et al., "Das Leben der Bakterien" de THIMANN, o la "Microbiology" de DAVIS et al., así como otros muchos libros de texto o manuales. No obstante, faltaba una visión global que presentase brevemente los conocimientos básicos necesarios de la Microbiología General, que fuese útil no sólo para el microbiólogo, sino también para los estudiosos de la Botánica, Zoología, Farmacia, Agronomía, Medicina, Química y Física. El presente libro va dirigido a este amplio círculo de lectores. Debe dar una visión general y, al mismo tiempo, proporcionar conocimientos específicos y ser estimulante. El libro presupone ciertos conocimientos biológicos, que se presentan, por ejemplo, en libros de Botánica o Zoología de esta misma serie de textos concisos. El libro debe estimular también al estudio profundo de campos fronterizos, en primer lugar de la Bioquímica General. Junto a un esqueleto de las reacciones químicas básicas del metabolismo, aquí únicamente expondremos con detalle las reacciones metabólicas típicas de los microorganismos.

El presente texto se concentra en la fisiología bacteriana, para dar una visión profunda de las interrelaciones básicas. La Biología se ha hecho más comprensible gracias al conocimiento de las relaciones moleculares. La variabilidad de las manifestaciones vitales y de las capacidades metabólicas se reducen a un número limitado de estructuras y procesos elementales, así como de planes metabólicos y de constitución, de cuyo conocimiento se pueden extraer principios heurísticos valiosos. Por ello, el conocimiento en profundidad conlleva un conocimiento generalista.

Agradecimientos: En primer lugar debo agradecer especialmente a mis colaboradores D. Claus, U. Eberhardt, G. Gottschalk y N. Pfennig por las múltiples ayudas, críticas y consejos. Una parte sustancial del trabajo la ha desarrollado la Dra. Karin Schmidl. Sin su ayuda en el diseño de las figuras, en la elaboración del manuscrito y en muchos trabajos de redacción no se hubiese concluido el manuscrito a tiempo. Agradezco al Sr. L. Schnellbacher la realización cuidadosa y comprensible de las figuras. Agradezco a la Sra. M. Welskop por escribir el manuscrito y por la elaboración del índice de materias.

Merecen también mi reconocimiento todos aquellos colegas que han puesto a mi disposición fotografías o figuras, publicadas o inéditas. También agradezco los permisos para la reproducción de figuras concedida por las editoriales.

Merece un reconocimiento especial la editorial Georg Thieme que ha decidido editar una serie de textos introductorios a las ciencias biológicas, bien presentados y a un precio asequible.

Gottingen, noviembre de 1968 H.G. Schlegel

Utilización de términos técnicos, nomenclatura y abreviaturas

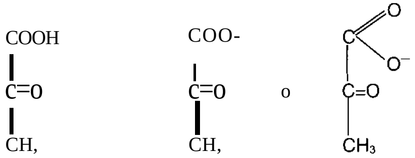
CAS DE MADRID

El autor del texto alemán original manifiesta que la utilización de términos técnicos, así como su ortografía, se deja en el ámbito de influencia del alemán al propio juicio del autor, o a los hábitos de las editoriales. Por ello, manifiesta las siguientes reglas en el texto original.

Deben utilizarse en pocas ocasiones las abreviaturas de los nombres genéricos de los microorganismos o de los términos bioquímicos, y en ese caso únicamente cuando el contexto asegure que no puede haber confusión. No obstante, en este libro se han utilizado ciertas abreviaturas, sobre todo en los numerosos esquemas de las rutas metabólicas.

Para que la lectura del texto sea sencilla para los microbiólogos sin una base bioquímica, se ha continuado con una convención actualmente incorrecta en la utilización de algunos términos. En particular, se ha obviado la indicación de la carga de los nucleótidos de nicotinamida (NAD en lugar de NAD+). Igualmente, la fórmula de los ácidos orgánicos o los ésteres fosfóricos se indica en su forma no disociada, pero en el texto se consideran como sales (lactato, piruvato, succinato, etc.).

ácido no disociado | tal como se presenta en condiciones fisiológicas



$$\begin{matrix} COOH \\ | \\ C{=}O \\ | \\ CH, \end{matrix} \qquad \begin{matrix} COO- \\ | \\ C{=}O \\ | \\ CH, \end{matrix} \quad o$$

nombre exacto	español:	ácido pirúvico
	latín:	acidum piruvicum
	inglés	pyruvic acid
nombre más utilizado	español:	piruvirato

Abreviaturas de uso frecuente

1. Aminoácidos

Ala	alanina
Arg	arginina
Asn (Asp-NH,)	asparagina
Asp	ácido aspártico
Cys	cisteína
Dab	ácido diaminobutírico
Dpm	ácido diaminopimélico
Gln íGlu-NH,)	glutamina
Glu	ácido glutámico
Gly	glicina
His	histidina
Ile	isoleucina
Leu	leucina
Lys	lisina
Met	metionina
Phe	fenilalanina
Pro	prolina
Ser	serina
Thr	treonina
Trp	triptófano
Tyr	tirosina
Val	valina

2. Nucleósidos fosfato

AMP, ADP, ATP	Adenosín mono(di, tri)fosfato
CMP, CDP, CTP	Citidín mono(di, tri)fosfato
GMP, GDP, GTP	Guanosín mono(di, tri)fosfato
IMP, !DP, ITP	lnosín mono(di, tri)fosfato
TMP, TDP, TTP	Timidín mono(di, tri)fosfato
UMP, UDP, UTP	Uridín mono(di, tri)fosfato
NuMP, NuDP, NuTP	Nucleosidín mono(di, tri)fosfato

3. Otras abreviaturas (en orden alfabético)

CoA	coenzima A
Cit	citocromo
CAT	ciclo de los ácidos tricarboxílicos
DH	deshidrogenasa
DNA	ácido desoxirribonucleico
EDTA	etilén diamino tetracetato
FAD	flavín adenín dinucleótido
FBP	fructosa-I,6-bifosfato
FMN	flavín mononucleótido
F-6-P	fructosa-6-fosfato
G-6-P	glucosa-6-fosfato
GAP	glicerín aldehído-3-fosfato
Gal-6-P	galactosa-6-fosfato
Gle	glucosa
GlcN	glucosamina
GlcNAc	N-acetilglucosamina
GSH	glutatión, forma reducida
KDPG	2-ceto-3-desoxi-6-fosfogluconato
M	molar
mol	moles
MurNAc	ácido N-acetilmurámico
NADíP)	nicotinamida adenín dinucleótido (fosfato)
NAD(P)H,	nicotinamida adenín dinucleótido (fosfato) reducido
PEP	fosfoenolpiruvato
3-PG	ácido 3-fosfoglicérico
6-PG	ácido 6-fosfoglicérico
PHB	ácido poli-B-hidroxibutírico
P,	fósforo inorgánico
Ⓟ	-PO,H_2
PK	fosfocetolasa
PP,	pirofosfato
R-5-P	ribosa-5-fosfato
Ru-5-P	ribulosa-5-fosfato
RuBP	ribulosa-1,5-bifosfato
RNA	ácido ribonucleico
Shu-7-P	sedoheptulosa-7-fosfato
ShuBP	sedoheptulosa-l,7-bifosfato
TA	transaldolasa
TCC	ciclo ácidos tricarboxílicos
TK	transcetolasa
TPP	tiaminadifosfato
UQ	ubiquinona
Xu-5-P	xilulosa-5-fosfato

índice de materias

Prefacio a la séptima edición , V
Prefacio a la primera edición. VII
Utilización de términos técnicos, nomenclatura y abreviaturas. IX
Abreviaturas de uso frecuente X

1. La posición de los microorganismos en la naturaleza. . . . I
1.1 Los tres reinos: Animales, Vegetales y Protistos. I
1.2 Procariotas y eucariotas 2
J.3 Evolución de los organismos 5
1.4 Participación en el ciclo de la materia. 7
1.5 Los microorganismos al servicio del hombre 12
1.6 Características generales de los microorganismos. 14

2. La célula y su estructura 17
2.1 La célula eucariota 17
2.2 La célula procariota 22
2.2.1 El núcleo bacteriano 25
2.2.2 Citoplasma, proteínas y ribosomas 36
2.2.3 Membranas ' 44
2.2.4 Pared celular. 50
2.2.5 Cápsulas y limos. 61
2.2.6 Flagelos y motilidad 65
2.2.7 Materiales de reserva y otras inclusiones celulares. 73
2.2.8 Endósporas y formas de persistencia. 79
2.2.9 Pigmentos de las bacterias y los hongos. 84

3. Los grupos de procariotas 89
3.1 Introducción. 89
3.2 Los grupos de los procariotas 95
3.3 Cocos Gram positivos. 98
3.4 Cocos Gram negativos. 99
3.5 Bacilos Gram positivos no esporulados 100
3.6 Bacterias corineformes 101
3.7 Micobacterias 103
3.8 Actinomicetos en sentido estricto 105
3.9 Bacilos y cocos formadores de endósporas 108
3.10 Pseudomonas y otros bacilos Gram negativos III
3.11 Bacilos Gram negativos, anaeróbicos facultativos 113

3.12 Bacterias anaeróbicas Gram negativas 114
3.13 Arqueobacterias 114
3.14 Bacilos curvados: espirilos y vibrios. 117
3.15 Espiroquetas. 119
3.16 Bacterias con movimiento deslizante , 122
3.17 Bacterias con apéndices y con yemas 128
3.18 Bacterias parásitas obligadas de células 130
3.19 Grupos de *Mycoplasma* " 132
3.20 Bacterias fototrópicas, anaeróbicas, anoxigénicas 134
3.21 Bacterias fototrópicas. aeróbicas, oxigénicas: cianobacterias. 135

4. Los virus: propagación y estructura 143
4.1 Virus 145
4.2 Virus bacterianos (bacteriófagos) 151
4.2.1 Multiplicación de un fago virulento: ciclo lítico 153
4.2.2 El desarrollo de fagos atenuados: lisogenia 156
4.3 Relación entre virus y plásmidos con la formación de tumores 162
4.4 Virus patógenos humanos importantes 167

5. Los hongos (Fungi = Mycota). 169
5.1 Acrasiomicetos (hongos mucosos celulares) 172
5.2 Mixomicetos (hongos mucosos verdaderos) 175
5.3 Ficomicetos (hongos inferiores) 176
5.4 Ascomicetos (hongos con ascas) 181
5.5 Basidiomicetos (hongos erectos). 188
5.6 Hongos imperfectos (deuteromicetos) 190

6. El crecimiento de los microorganismos. 193
6.1 Nutrición de los microorganismos 193
6.2 Medios de cultivo y condiciones de crecimiento. 196
6.3 Tipos nutricionales 203
6.4 Métodos de cultivo selectivo 204
6.5 Fisiología del crecimiento 208
6.5.1 Métodos de determinación del número de células y de la masa bacteriana 209
6.5.2 Crecimiento exponencial y tiempo de generación 211
6.5.3 Crecimiento bacteriano en cultivo discontinuo 213
6.5.4 Parámetros de la curva de crecimiento 217
6.5.5 Crecimiento bacteriano en cultivo continuo 218
6.5.6 Sincronización de la división celular 222
6.6 Inhibición del crecimiento y destrucción. 222
6.6.1 Métodos de esterilización 226
6.6.2 Procesos de conservación 231

7. Mecanismos básicos del metabolismo y de la obtención de energía . 235
7.1 Bases . 236
7.2 Vías de degradación de las hexosas . 247
7.2.1 Vía de la fructosa-I ,6-bifosfato (glucolisis) . 248
7.2.2 Vía de la pentosa fosfato . 251
7.2.3 Vía del 2-ceto-3-desoxi-6-fosfogluconato . 252
7.2.4 Oxidación del piruvato . 254
7.3 Ciclo de los ácidos tricarboxílicos . 256
7.4 Cadena respiratoria y fosforilación en el transporte de electrones . 258
7.5 Ciclos auxiliares y gluconeogénesis . 274
7.6 Biosíntesis de algunos compuestos de bajo peso molecular .. 280
7.7 Asimilación de sustancias por la célula . 283

8. Fermentaciones especiales . 291
8.1 Fermentación alcohólica por levaduras y bacterias . 295
8.2 Fermentación láctica y Lactobacteriáceas . 302
8.3 Fermentación propiónica y propionibacterias . 310
8.4 Fermentación fórmica y Enterobacteriáceas . 313
8.5 Fermentación butirato-butanol por clostridios . 323
8.6 Fermentación homoacética: anhídrido carbónico como aceptor de hidrógenos . 332
8.7 Productos naturales fermentables y no fermentables . 334

9. Transporte de electrones en condiciones anaeróbicas 337
9.1 Respiración de nitratos: desnitrificación y amonificación del nitrato . 339
9.1.1 Respiración de nitrato: desnitrificación . 339
9.1.2 Respiración de nitrato: amonificación del nitrato . 341
9.2 Formación de sultllídrico por reducción del sulfato . 343
9.3 Formación de sulfuro de hidrógeno por reducción del azufre . 350
9.4 Metanogénesis por reducción del carbonato . 351
9.5 Formación de acetato por reducción del carbonato . 357
9.6 Formación de succinato por reducción del fumarato . 358
9.7 Reducción de los iones hierro (IJI) a hierro (II) . 360

10. Oxidaciones incompletas y biotecnología aplicada . 363
10.1 FOlllación de acético y bacterias del ácido acético . 363
10.2 Producción de otros ácidos orgánicos . 366
10.2.1 Fisiología y biotecnología . 366
10.2.2 Química de la producción de ácidos por hongos . 370
10.3 Producción de aminoácidos . 372

IOA Transfonnación de sustancias por los microorganismos 373
10.5 Producción de antibióticos . 375
10.5.1 Organismos y descubrimiento . 375
10.5.2 Antibióticos de importancia terapéutica . 380
10.5.3 Micotoxinas . 383
10.6 Vitaminas . 384
10.7 Exopolisacáridos . 385
10.8 Enzimas . 386
10.9 Biomasa . 388

11. Dadores inorgánicos de hidrógenos: bacterias aeróbicas quimiolitotrofas . 389
11.1 Oxidación del amonio y del nitrito: nitrificación . 390
11.2 Oxidación de compuestos reducidos de azufre . 394
11.3 Oxidación del hieno (H) . 397
11.4 Oxidación del hidrógeno molecular. . 399
11.5 Fijación del anhídrido carbónico . 403

12. Bacterias fototróficas y fotosíntesis . 409
12.1 Bacterias rojas del azufre, bacterias rojas sin azufre y bacterias verdes del azufre . 409
12.1.1 Pigmentos del aparato fotosintético . 419
12.1.2 Metabolismo . 423
12.1.3 Distribución de las bacterias fototróficas . 425
12.2 Los procesos elementales de la fotosíntesis . 428
12.2.1 Fotosíntesis anoxigénica . 430
12.2.2 Fotosíntesis oxigénica . 433
12.2.3 Resumen de los procesos elementales de la fotosíntesis . 437
12.3 Utilización de la energía luminosa por las halobacterias . 438

13. Fijación del nitrógeno molecular . 441
13.1 Fijación de nitrógeno por bacterias simbióticas . 441
13.1.1 Nódulos en las raíces de las leguminosas . 442
13.1.2 Nódulos en las raíces de no leguminosas . 445
13.1.3 Simbiosis con cianobacterias fijadoras de N_2 446
13.2 Fijación de nitrógeno por bacterias de vida libre y cianobacterias . 446
13.3 Bioquímica de la fijación de nitrógeno . 448

14. Degradación de los productos naturales . 453
14.1 Celulosa . 455
14.2 Xilano . 460
14.3 Almidón y otros glucanos . 462

14.4 Fructanos.................................... 465
14.5 Manano 466
14.6 Pectina 466
14.7 Agar 467
14.8 Quitina 468
14.9 Lignina 469
14.10 Formación de humus 472
14.11 Hidrocarburos 474
14.11.1 Metano 475
14.11.2 Etano, propano y butano 477
14.11.3 Hidrocarburos alifáticos de cadena larga 478
14.11.4 Hidrocarburos aromáticos 479
14.12 Proteínas 486

15. Constancia, modificación y transferencia de la información genética . 493
15.1 Mutación y mutagénesis . 494
15.1.1 El carácter no direccional de la mutación . 494
15.1.2 Mutaciones espontáneas e inducidas . 496
15.1.3 Tipos de mutaciones . 497
15.1.4 Agentes mutágenos y su acción . 500
15.1.5 Expresión y selección de determinados fenotipos mutantes . 503
15.1.6 Reparación del DNA . 509
15.1.7 Prueba o test de mutagenicidad . 510
15.2 Transferencia de caracteres y recombinación genética . 511
15.2.1 Recombinación genética . 512
15.2.2 Transformación . 516
15.2.3 Transducción . 519
15.2.4 Conjugación . 521
15.3 Plásmidos . 527
15.3.1 Características y demostración de la presencia de los plásmidos . 528
15.3.2 Significación biológica de los plásmidos . 530
15.4 Restricción y modificación del DNA . 536
15.5 Técnica molecular de clonación . 539

16. La regulación del metabolismo . 549
16.1 Regulación de la síntesis enzimática . 551
16.1.1 Inducción . 551
16.1.2 Represión . 554
16.1.3 Mecanismos de regulación . 558
16.2 Regulación por modificación de la actividad catalítica del enzima . 564

16.2.1 Mecanismos de regulación 564
16.2.2 Modelos especiales de regulación 570
16.3 Mutantes defectivos en la regulación 577

17. Microorganismos y medio ambiente . 581
17.1 Ecología de los microorganismos . 582
17.1.1 Introducción . 582
17.1.2 Ecosistemas acuáticos . 585
17.2 Microorganismos como miembros de una simbiosis . 593
17.2.1 Simbiosis mutualistas . 594
17.2.2 Simbiosis antagónicas . 602
17.3 Microorganismos y desanollo tenestre . 604
17.4 Evolución de los microorganismos . 606

Bibliografía. 613

Vocabulario 619

Índice alfabético. 625

1. La posición de los microorganismos en la naturaleza

1.1 Los tres reinos: Animales, Vegetales y Protistos

Las diferencias en la forma y la estructura entre los animales y las plantas, en las que hasta el siglo pasado se basaba la clasificación de los seres vivos, son bien notorias. Estas diferencias se pueden atribuir a las diferencias fundamentales en los tipos de nutrición. Los **animales** se alimentan de sustancias orgánicas ya formadas (C-heterótrofos), que son elaboradas, digeridas y asimiladas en el interior del cuerpo, en el tracto intestinal. Del desarrollo embrionario puede deducirse que esta cavidad corporal tiene su origen en la invaginación de la blástula. El desarrollo animal tiende a la constitución de superficies internas de absorción. Este principio de constitución se ve realizado desde los celentéreos (Hidrozoos; ejemplo: hidra de agua dulce) hasta los vertebrados superiores.

Al otro tipo de nutrición totalmente distinto (C-autótrofos) le corresponden las **plantas**, de constitución básicamente distinta. Obtienen las sustancias necesarias para la formación de su cuerpo a partir de sustancias inorgánicas y utilizan la luz solar como fuente energética. Las células y los tejidos fotosintéticamente activos, con los pigmentos captadores de radiaciones (clorofilas y carotenoides) están orientados hacia el exterior, y forman amplias superficies externas. Otras diferencias generales entre animales y vegetales se refieren a la presencia de paredes celulares, a la capacidad de movimiento activo y cambio de lugar, y a la capacidad de síntesis de determinadas sustancias.

Los reinos vegetal y animal pudieron delimitarse de forma precisa mientras se conocía poco a los microorganismos. Incluso los hongos tenían tantos caracteres en común con los vegetales, que sin tener en cuenta su tipo heterotrófico de nutrición, podían incluirse entre las plantas. Más difícil resultó decidir a qué reino pertenecían las bacterias, los mixomicetos, y otros seres unicelulares.

Para el **tercer reino de los seres vivos** se creó el nombre colectivo de **Protistos**. Así, ERNST HAECKEL (1866) ordenó al mundo de los organismos en tres grupos principales o reinos: animal, vegetal y de los protistos. Basándose en las teorías de la selección y de la herencia de CHARLES DARWIN (1859) reunió HAECKEL a todos los géneros y especies vegetales y animales conocidos hasta el momento bajo el punto de vista de su posible desarrollo y distribuyó en un **árbol filogenético** (Fig. 1.1) la posible evolución a partir de una raíz común, "*Radix communis organismorum*", de todos los organismos vivos conocidos hasta el momento. HAECKEL aún no tenía una idea clara del reino de los protistos.

El tercer reino de los **Protistos** incluye a aquellos organismos que se separan de los animales y los vegetales por una diferenciación morfológica muy escasa; la mayoría son unicelulares. En base a su estructura celular pueden dividirse los protistos en dos grupos perfectamente delimitados: los **protistos superiores** se parecen en cuanto a la constitución de sus células a los animales y a las plantas; son eucariotas. A ellos pertenecen las algas, los hongos, y los protozoos. Entre los **protistos inferiores** se cuentan las bacterias y las cianobacterias (algas verde azules); son procariotas, y se diferencian por su constitución celular de todos los demás organismos. La denominación **microorganismos** hace referencia a las reducidas dimensiones de los organismos citados, y por su significado corresponde a la denominación de protistos. Los **virus,** como partículas no celulares, se contraponen a todos los organismos; no pueden reproducirse por sí solos, sino que para su reproducción requieren células vivas.

1.2 Procariotas y eucariotas

La unidad física básica de los organismos es la célula; es la unidad viva menor. La composición de sustancias es común a todos los seres vivos. Los componentes básicos de la célula son el ácido desoxirribonucleico (DNA), el ácido ribonucleico (RNA), las proteínas, los lípidos y los fosfolípidos. No obstante, el estudio en detalle de la composición y estructura fina de distintos tipos celulares ha revelado diferencias significativas entre las bacterias y las cianobacterias por una parte, y los animales y los vegetales por otra, aun incluyendo a los representantes microscópicos más pequeños de estos últimos. Estas diferencias son tan profundas, que los dos grupos se pueden contraponer con las denominaciones de procariotas y eucariotas. En los procariotas hay que ver las reliquias de los primeros tiempos de la evolución de los organismos, y su evolución hasta los eucariotas plantea la mayor discontinuidad en la evolución de los organismos. En la figura 1.2 se representa gráficamente la división de los organismos en los tres grupos superiores principales, así como su división en dos grandes mundos, el de los **procariotas** y el de los **eucariotas.**

Los **eucariotas** tienen un verdadero núcleo (karyon). En él se encuentra la mayor parte del genoma de la célula eucariota. El genama se distribuye en una serie de cromosomas, que tras su duplicación se separan en el proceso denominado mitosis. En los cromosomas el DNA se encuentra asociado a histonas. La célula eucariota contiene orgánulos, las mitocondrias y (en los vegetales) los cloroplastos; éstos contienen otra parte del genoma,

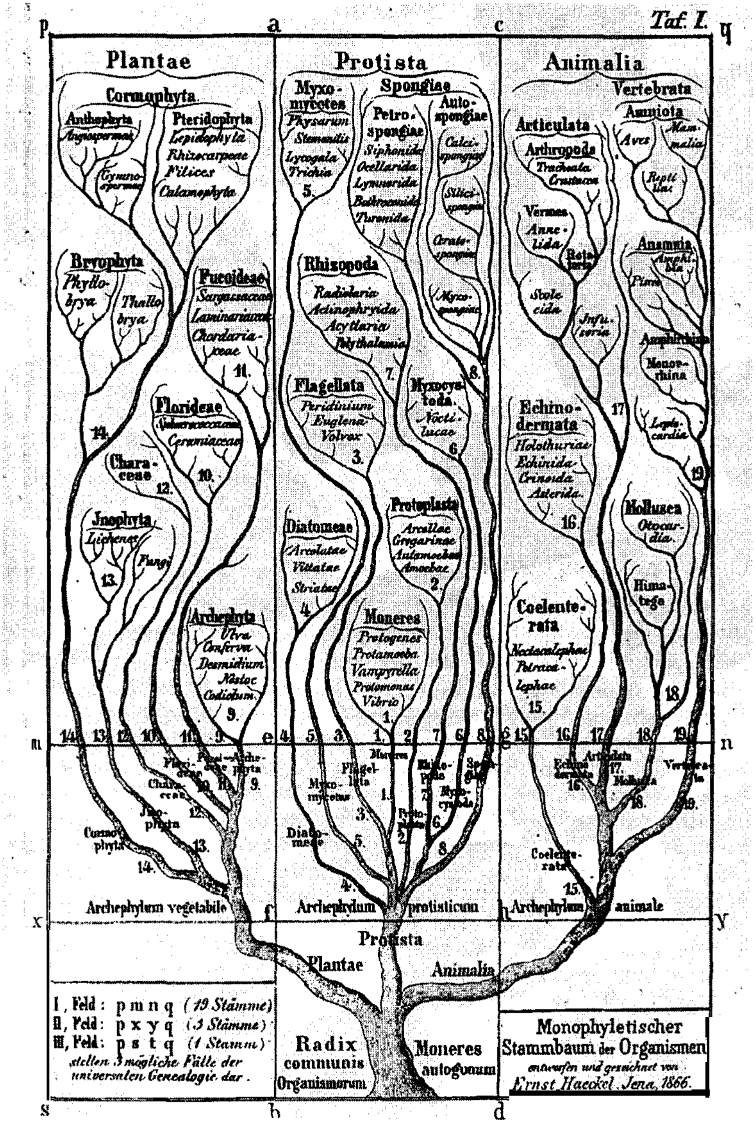

Taf. I.
Plantae
Protista
Animalia
Cormophyta
Anthophyta
Angiospermae
Gymnospermae
Pteridophyta
Lepidophyta
Rhizocarpeae
Filices
Calamophyta
Bryophyta
Phyllobrya
Thallobrya
Fucoideae
Sargassaceae
Laminariaceae
Chordariaceae
Florideae
Ceramiaceae
Characeae
Inophyta
Lichenes
Fungi
Archephyta
Ulva
Conferva
Desmidium
Nostoc
Codiolum
Myxomycetes
Physarum
Stemonitis
Lycogala
Trichia
Spongiae
Petrospongiae
Autospongiae
Calcispongiae
Silicispongiae
Myxospongiae
Rhizopoda
Radiolaria
Acinetae
Acyttaria
Polythalamia
Flagellata
Peridinium
Euglena
Volvox
Myxocystoda
Noctiluca
Diatomeae
Protoplasta
Arcellae
Gregarinae
Amoebae
Moneres
Protogenes
Protamoeba
Vampyrella
Protomonas
Vibrio
Vertebrata
Amniota
Aves
Mammalia
Reptilia
Articulata
Arthropoda
Tracheata
Crustacea
Vermes
Annelida
Rotatoria
Scolecida
Infusoria
Anamnia
Amphibia
Pisces
Amphirhina
Monorrhina
Leptocardia
Echinodermata
Holothuriae
Echinida
Crinoida
Asterida
Mollusca
Otocardia
Himatega
Coelenterata
Nectacalephae
Petracalephae
Archephylum vegetabile
Archephylum protisticum
Archephylum animale
Protista
Plantae
Animalia
I, Feld: p m n q (19 Stämme)
II, Feld: p x y q (3 Stämme)
III, Feld: p s t q (1 Stamm)
stellen 3 mögliche Fälle der universalen Genealogie dar.
Radix communis Organismorum
Moneres autogonum
Monophyletischer Stammbaum der Organismen
entworfen und gezeichnet von Ernst Haeckel. Jena, 1866.
p
a
c
q
m
e
n
x
f
h
y
s
b
d

Fig. 1.1 El primer árbol filogenético (de HAECKEL, E.: "Allgemeine Entwicklungsgeschichte der Organismen", Historia General del Desarrollo de los Organismos, Berlín, 1866).

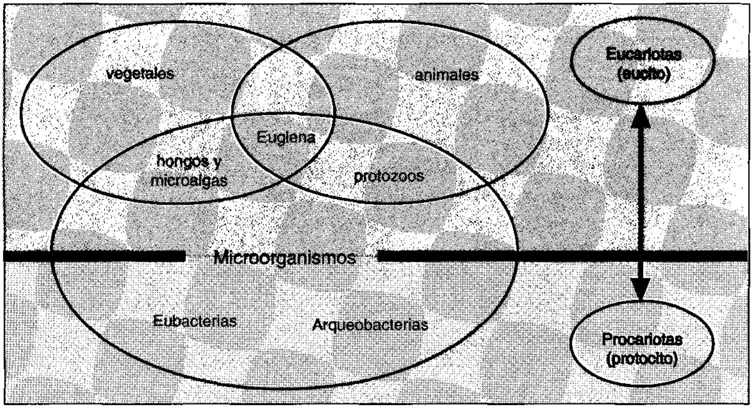


Fig. 1.2 Los tres reinos, vegetales, animales y microorganismos, y la diferenciación entre procariotas y eucariotas.

muy pequeña, y en forma de molécula de DNA circular y cerrada. Los ribosomas son grandes (SOS).

Los procariotas carecen de un núcleo rodeado por una membrana. El DNA se presenta en forma de una hebra circular cerrada libre en el citoplasma. Este cromosoma bacteriano lleva toda la información necesaria para la reproducción de la célula. Junto a él pueden presentarse pequeñas moléculas circulares, cerradas de DNA, los plásmidos; no obstante, éstos no son imprescindibles. La célula procariota no presenta orgánulos; la subdivisión de la célula en compartimentos es mucho menos acusada que en la célula eucariota. Los ribosomas son pequeños (70S). La naturaleza de los ribosomas y de los enzimas implicados en la síntesis proteica, así como la composición de la pared celular procariota, son la causa de la acción específica de varios antibióticos. Otras diferencias se presentarán más adelante (véase pág. 22 Y sig.).

Morfológicamente los procariotas están relativamente poco diferenciados. Según su aspecto sólo pueden diferenciarse unas pocas formas, que generalmente se reducen a la esfera y al cilindro recto o curvado como formas básicas. A esta "uniformidad" se opone una versatilidad y flexibilidad fisiológicas sin par. Mientras que los animales y las plantas necesitan siempre oxígeno, muchos grupos de procariotas pueden vivir en ausencia de aire (en condiciones anaeróbicas), y de extraer la energía necesaria para el crecimiento a través de fermentaciones o respiraciones anaeróbicas. Otros grupos pueden utilizar la energía luminosa y obtener el material celular a partir de compuestos orgánicos o de anhídrido carbónico.

Además, otras bacterias son capaces de obtener energía por oxidación de compuestos o elementos inorgánicos. También está ampliamente extendida la capacidad de fijar el nitrógeno molecular.

El hecho de que los procariotas se hayan convertido en los últimos treinta años en el objeto preferido de la Biología general se debe a esta multiplicidad y flexibilidad fisiológicas, a las elevadas tasas de síntesis y al rápido crecimiento, a la sencilla constitución celular, y a la estructura poco complicada del material celular. Esta circunstancia, así como el limitado espacio, son suficientes para justificar que la presente introducción a la Microbiología se ocupe preferentemente de la biología de las bacterias.

1.3 Evolución de los organismos

Resultó difícil trasladar las ideas de HAECKEL a los procariotas mientras no se tenía más que un conocimiento mínimo de la diversidad bacteriana y casi no se sabía nada de la estrucutra molecular de los componentes de los organismos. La evolución de los microorganismos (apartado 17.4) fue objeto durante largo tiempo de especulaciones controvertidas. Se llegó a **un árbol filogenético de** los **procariotas** cuando C. WOESE aisló y secuenció las bases del RNA de los ribosomas, el RNAr, de un gran número de bacterias. A partir del grado de semejanza entre las secuencias de bases de diversos procariotas pudo extraerse la conclusión de que todos los procariotas derivan de una raíz común (también denominado progenote) y que ya en tiempos tempranos los procariotas se dividieron en dos grandes grupos, las **arqueobacterias** y las **eubacterias** (Cap. 3 y apartado 17.4).

Actualmente podemos también decir algo acerca del **lapso de tiempo** de la evolución biológica inicial, en el que se desarrollaron los diversos grupos bacterianos a partir del progenote (Fig. 1.3). El desarrollo de las vías metabólicas básicas de las bacterias tiene que haber tenido lugar en un tiempo muy temprano. Ello se puede concluir a partir de las proporciones entre los isótopos 11C/^{12}C del carbono orgánico (C_{org}) que se ha fijado desde hace más de 3800 millones de años en los sedimentos. La composición en isótopos de este C_{org} (o también llamado kerógeno) es la misma que la de las bacterias y vegetales recientes. De ello se puede concluir que el C_{org} de los sedimentos del arcaico temprano procede de bacterias autótrofas. De las proporciones entre isótopos aún no puede deducirse si los productores primarios de biomasa eran bacterias fototróficas o bacterias metanogénicas de respiración anaeróbica (apartado 9.4).

Los **estromatolitos,** rocas sedimentarias biogénicas, se tienen también en cuenta para la datación de las actividades biológicas en la historia de la

Tierra, y su formación se ha de atribuir a la actividad de los organismos autotróficos. Tiene que haber habido cianobacterias fotosintéticas hace ya unos 2900 millones de años. Su actividad condujo a la producción de oxígeno. No obstante, este oxígeno fue captado por compuestos reducidos de hierro, que se oxidaron a compuestos insolubles de hierro y que precipitaron como rocas ferruginosas bandeadas ("banded iron formations" = BIF's) en los márgenes de las cuencas de los mares (Fig. 1.3). Los conocimientos anteriores conducen a la suposición de que los descendientes de los procariotas que vivían en aquellos momentos son los organismos más antiguos, y que el metabolismo universal se ha desarrollado a nivel de los procariotas. La evolución de los procariotas no pudo tener lugar hasta que la actividad de las cianobacterias permitió la aparición de una atmósfera oxigenada estable.

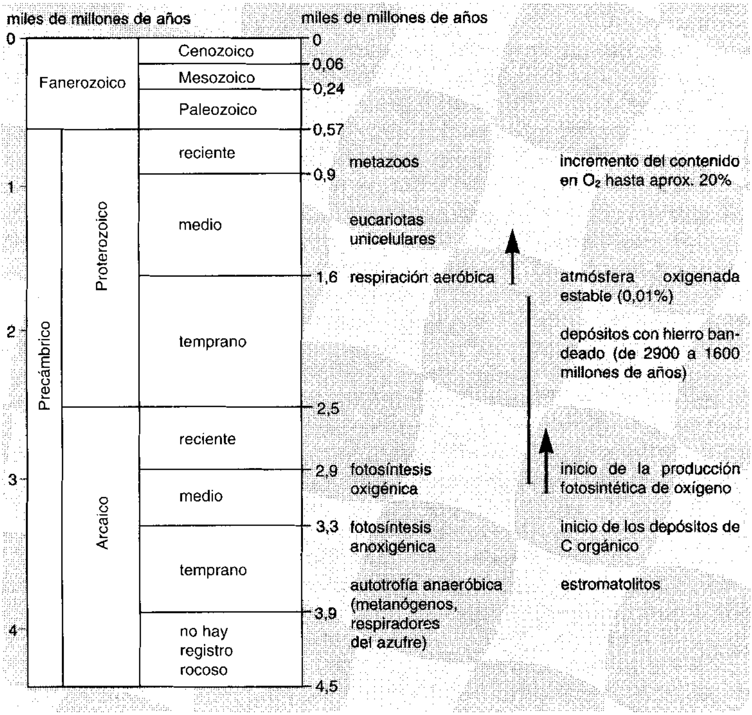

miles de millones de años
0
1
2
3
4
Fanerozoico
Precámbrico
Proterozoico
Arcaico
Cenozoico
Mesozoico
Paleozoico
reciente
medio
temprano
reciente
medio
temprano
no hay registro rocoso
miles de millones de años
0
0,06
0,24
0,57
0,9
1,6
2,5
2,9
3,3
3,9
4,5
metazoos
eucariotas unicelulares
respiración aeróbica
fotosíntesis oxigénica
fotosíntesis anoxigénica
autotrofía anaeróbica (metanógenos, respiradores del azufre)
incremento del contenido en O_2 hasta aprox. 20%
atmósfera oxigenada estable (0,01%)
depósitos con hierro bandeado (de 2900 a 1600 millones de años)
inicio de la producción fotosintética de oxígeno
inicio de los depósitos de C orgánico
estromatolitos

Fig. 1.3 La edad de la Tierra. La escala temporal se indica en miles de millones de años.

1.4 Participación en el ciclo de la materia

Según su papel y función en la economía de la naturaleza se divide a los organismos en tres grupos. Las plantas verdes producen materia orgánica utilizando energía solar y anhídrido carbónico, y se les denomina **productores**. Los animales son **consumidores**; consumen gran cantidad de la biomasa primaria para la síntesis de su propio cuerpo. Plantas y animales sufren por último una descomposición, en la que la materia orgánica se transforma en compuestos minerales, inorgánicos. En este proceso denominado **mineralización** están implicados en primer lugar hongos y bacterias. Actúan en la economía de la naturaleza como **descomponedores**. Los bioelementos, por tanto, están sometidos a procesos cíclicos. A continuación daremos brevemente alguna noción de los ciclos biogeoquímicos del carbono, el nitrógeno, el fósforo y el azufre.

Ciclo del carbono. En el ciclo del carbono cumplen los microorganismos su función más importante en el mantenimiento de la vida sobre la tierra. Se encargan de la mineralización del carbono transformado en materia orgánica por las plantas verdes, y con ello del mantenimiento de un equilibrio muy delicado (Fig. 1.4). El aire atmosférico contiene poco más del 0,03% de anhídrido carbónico (12 μmol/l). La capacidad fotosintética de las plantas verdes es tan grande, que la reserva de CO_2 atmosférica se agotaría en poco menos de veinte años. Para nuestra medida del tiempo es un lapso relativamente corto; sin embargo, se calcula que las reservas de energía y de carbono de la Tierra pueden durar entre 1000 y 3000 años. Incluso si se tienen en cuenta las reservas de los océanos, la reserva de anhídrido carbónico sólo duraría unos 2000 años.

Las plantas verdes tendrían que detener pronto su fijación de anhídrido carbónico si animales inferiores y microorganismos no asegurasen la continua **mineralización** de la **materia orgánica** para una regeneración de anhídrido carbónico. Las bacterias y los hongos del suelo no tienen una importancia menor que las plantas verdes fotosintéticamente activas en la economía de la materia en la Tierra. En el ciclo del carbono es donde queda más clara la interdependencia de todos los seres vivos de la Tierra.

Indiquemos todavía una particularidad del proceso de mineralización. Una pequeña parte del carbono mineralizado (1-1,5%) no llega a la atmósfera en forma de CO_2, sino como metano. Este gas se produce a partir de la materia orgánica en aquellos hábitats a los que no llega el oxígeno atmosférico (tundra, arrozales, panza de los rumiantes), pasa a la atmósfera, y allí, por oxidación de los radicales OH del aire pasa a través de monóxido de carbono (CO) hasta CO_2. En la formación de metano, así como de otros gases que se encuentran en trazas (H_2, CO, N_2O, NO_2) participan principalmente bacterias.

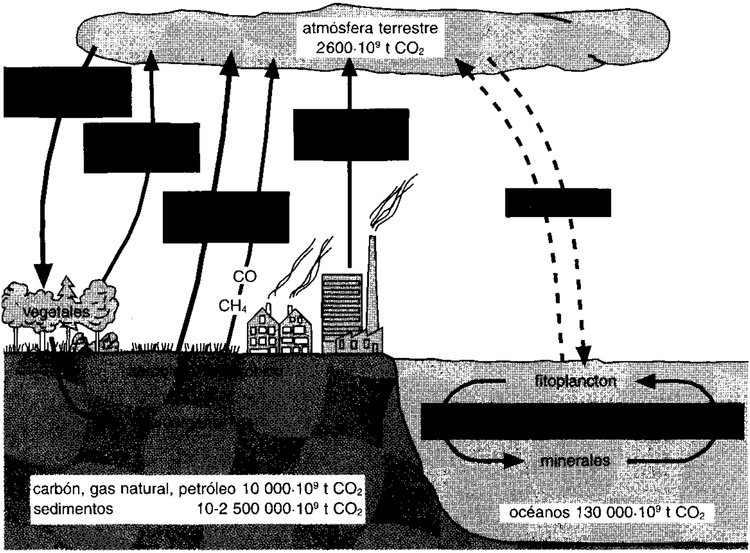

atmósfera terrestre
2600·10⁹ t CO₂
[redacted]
[redacted]
[redacted]
[redacted]
[redacted]
vegetales
CO
CH₄
fitoplancton
[redacted]
minerales
carbón, gas natural, petróleo 10 000·10⁹ t CO₂
sedimentos 10-2 500 000·10⁹ t CO₂
océanos 130 000·10⁹ t CO₂

Fig. 1.4 Ciclo del carbono en la biosfera. Las cantidades indicadas en las flechas se refieren a las transformaciones anuales de anhídrido carbónico (fijación, producción, intercambio). La fijación fotosintética de CO_2 por las plantas verdes agotaría rápidamente las reservas de anhídrido carbónico de la atmósfera si la materia orgánica no fuese descompuesta y oxidada a anhídrido carbónico por los microorganismos. La combustión de hidrocarburos fósiles (petróleo, gas natural, carbón) conduce a un incremento paulatino del contenido en CO_2 de la atmósfera.

A primera vista el mar parece representar una poderosa reserva de anhídrido carbónico. Frente a esto se puede argüir que la velocidad de intercambio del anhídrido carbónico atmosférico con el del mar, presente en forma de CO_3^- en más de un 90%, es muy baja; en un año se intercambia únicamente 1/10 del anhídrido carbónico del aire con el del mar. Además, en el intercambio gaseoso participa sólo una delgada capa superficial. Las grandes cantidades de CO_2 que se encuentran por debajo de la termoclina en los océanos sólo llegan a la superficie en unas pocas regiones de afloramiento (África occidental, Chile) y allí enriquecen también la atmósfera en CO_2 (0,05%). Desde hace varios años está aumentando continuamente el contenido en anhídrico carbónico de la atmósfera. Este incremento puede atribuirse en parte a la combustión de petróleo y de carbón; en el año 1976 se transformaron en total unas $3{,}2 \cdot 10^9$ t de petróleo en la Tierra, la mayor parte de las cuales se quemó. Por otra parte, el incremento en el contenido de CO_2 también se debe a un descenso de la fijación fotosintética del CO_2, por la desforestación de grandes superficies y la degradación del suelo. Los océanos constituyen un poderoso sistema tampón de CO_2 y actúan como compensadores del contenido en CO_2 de la atmósfera.

En el mecanismo bioquímico de la fijación fotosintética del anhídrido carbónico por las plantas verdes participan en primer lugar azúcares y compuestos relacionados. Temporalmente el anhídrido carbónico fijado se almacena en las plantas leñosas y herbáceas en forma de azúcares polimerizados; casi el 60% del anhídrido carbónico fijado en el campo conduce a la producción de madera. La madera está compuesta en un 75% de polisacáridos (celulosa, hemicelulosa, almidón, pectinas y arabinogalactanos) y tan sólo algo más del 20% de ligninas y lignanos; el contenido proteico es pequeño (1%). En las gramíneas y plantas herbáceas el porcentaje en polisacáridos es aún mayor.

El predominio de los polisacáridos entre los productos de asimilación de las plantas verdes explica la importancia de los **azúcares como sustancias nutritivas** para todos aquellos seres vivos que requieren materia orgánica para su alimentación. La glucosa y otros azúcares no sólo constituyen en forma de polímeros los sustratos predominantes por su masa en el proceso de mineralización en la naturaleza, sino que en forma de monómeros constituyen las sustancias nutritivas preferidas por la mayoría de los microorganismos heterótrofos.

Ciclo del nitrógeno. En el centro del ciclo del nitrógeno se encuentra el amonio (Fig. 1.5). Éste es el producto de degradación de las proteínas y aminoácidos, que llegan al suelo con la materia animal y vegetal muerta. En los suelos bien aireados el amonio está sometido a la nitrificación; a través de las bacterias *Nitrosomonas* y *Nitrobacter* el amonio se oxida a nitrito y nitrato. Tanto el amonio como el nitrato pueden ser utilizados por las plantas en la asimilación como fuente de nitrógeno. Si el nitrato se encuentra en ausencia de oxígeno tiene lugar una pérdida de nitrógeno (desnitrificación). Las bacterias implicadas utilizan entonces el nitrato como fuente de oxígeno (aceptor de hidrógenos), "respiran" por tanto con NO_3^- en lugar de O_2; por ello se habla de una "respiración de nitratos". La desnitrificación conduce a pérdidas de nitrógeno del suelo. También hay bacterias capaces de fijar nitrógeno. Las bacterias fijadoras de nitrógeno viven libres en el suelo (no simbióticas) o en simbiosis con plantas superiores (fijadores simbióticos del nitrógeno). Junto a los animales y las plantas, las bacterias participan principalmente en el ciclo del nitrógeno.

Ciclo del fósforo. En la biosfera el fósforo se encuentra casi exclusivamente en forma de fosfato. En los organismos el ácido fosfórico está fijado en forma de éster. Los ésteres se disocian rápidamente al morir las células, y se liberan los iones fosfóricos. La forma del fósforo en el suelo que es captable por las plantas son los iones libres del ácido ortofosfórico, H_3PO_4. Su concentración es frecuentemente muy baja; la limitación del crecimiento de los organismos no se debe por lo general a una deficiencia en fosfatos, sino a la formación de compuestos de fosfato difícilmente

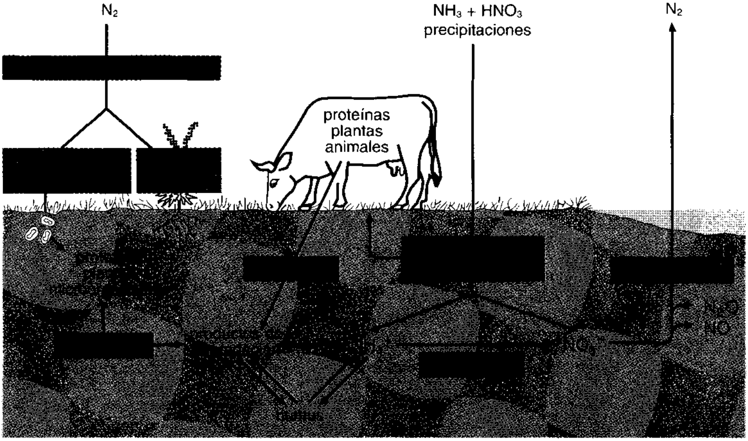


Fig. 1.5 Ciclo del nitrógeno.

solubles, como el apatito y los complejos de metales pesados. Las reservas de fosfatos que puedan descomponerse son abundantes, y no limitará la producción agrícola en un futuro previsible; no obstante, los fosfatos hay que transformarlos en su forma soluble. En muchos lugares los fosfatos de los abonos llegan a los ríos y a los lagos. Como sus concentraciones en iones hierro, calcio y aluminio no son frecuentemente altas, el fosfato permanece soluble y conduce a la eutrofización de las aguas, sobre todo favoreciendo a las cianobacterias fijadoras de nitrógeno. En los suelos la mayoría de las veces los fosfatos se fijan rápidamente en forma de sales insolubles.

Ciclo del azufre. En las células vivas el azufre se encuentra principalmente en forma de grupo mercaptano, formando parte de aminoácidos azufrados (cisteína, metionina, homocisteína). Su porcentaje en el peso seco de los organismos es del 1%. En la descomposición anaeróbica de la materia orgánica los grupos mercaptano se disocian mediante *desulfurasas*; a la formación de sulfhídrico en el curso de la mineralización en condiciones anaeróbicas se la denomina también desulfuración. Sin embargo, la mayor parte del sulfhídrico que aparece en la naturaleza se debe a la reducción disimilatoria del sulfato por las bacterias desulfuricantes (bacterias reductoras de sulfatos; Fig. 9.4 y pág. 343 y sig.).

Este sulfhídrico producido en los sedimentos anóxicos de las aguas puede ser oxidado a azufre y sulfato por bacterias fototrofas anaeróbicas (Cromatiáceas, pág. 412 y 423). Si el sulfhídrico llega a zonas que contienen

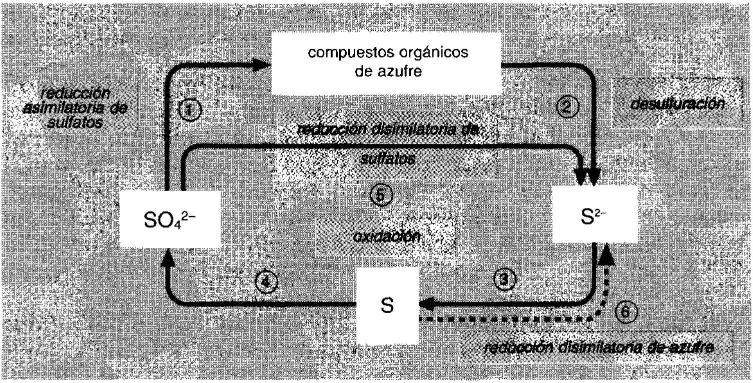

compuestos orgánicos de azufre
reducción asimilatoria de sulfatos
①
②
desulfuración
reducción disimilatoria de sulfatos
⑤
SO_4^{2-}
S^{2-}
oxidación
④
③
S
⑥
reducción disimilatoria de azufre

Fig. 1.6 Ciclo del azufre. (1) A través de la reducción asimilatoria del sulfato se reduce éste al nivel del sulfuro y se fija transitoriamente en forma orgánica a las proteínas de los seres vivos. (2) El azufre se libera de los aminoácidos por degradación de las proteínas y eliminación de S^{2-}. (3 y 4) El sulfuro puede oxidarse bajo condiciones aeróbicas abióticamente hasta azufre o sulfato, o bien por bacterias (*Beggiatoa*, *Thiothrix*) hasta sulfato pasando por azufre. El azufre libre es oxidado aeróbicamente por los *Thiobacilli* hasta sulfato (4). Bajo condiciones anaeróbicas el sulfuro puede ser oxidado por las bacterias fototróficas hasta azufre (*Chlorobium*) o sulfato (*Chromatium*). (5) En condiciones anaeróbicas el sulfato puede reducirse a sulfuro a través de la reducción disimilatoria de sulfatos por los desulfuricantes (*Desulfovibrio*, *Desulfotomaculum*) y por la reducción disimilatoria del azufre (6) éste puede ser reducido a sulfuro por *Desulfuromonas*.

oxígeno se oxida a sulfato de forma abiótica o a través de las bacterias aeróbicas del azufre (pág. 394). El azufre necesario para la síntesis de los aminoácidos azufrados lo obtienen las plantas y los microorganismos a través de la reducción asimilatoria de sulfatos. Los animales necesitan asimilar compuestos reducidos de azufre con los alimentos (Fig. 1.6).

Limitación de la producción de biomasa por el fósforo y el nitrógeno. Los elementos limitantes del crecimiento de las plantas, y con ello de la producción de biomasa, son el fósforo y el nitrógeno. Son los factores limitantes del crecimiento en los campos y en los océanos. Para las aguas marinas se tienen datos exactos. De la tabla 1.1 puede deducirse la biomasa (en gramos de peso seco) que puede formarse a partir de los elementos contenidos en 1 m^3 de mar. De 28 g de carbono (C) pueden producirse 60-100 g de biomasa, de 0,3 g de nitrógeno (N) 6 g, y de 0,03 g de fósforo (P) sólo 5 g. Esto indica que la producción de biomasa está limitada en último término por los fosfatos. Por consiguiente, en el agua de mar los organismos fijadores de nitrógeno, las cianobacterias, no tienen ventajas selectivas.

Tabla 1.1 Distribución de los bioelementos en el agua marina.

Elemento	g por 100 g de organismos secos "N"	g en 1 m^3 de agua "A"	Relación A/N
Potasio	1	390	390
Carbono	30	28	~1
Silicio	0,5	0,5	1
Nitrógeno	5,0	0,3	0,06
Fósforo	0,6	0,03	0,05
Azufre	1	900	900
Hierro	1	0,05	0,05
Vanadio	0,003	0,0003	0,1

A partir de K. KALLE, Das Meerwasser als Mineralstoffquelle der Pflanze, Handbuch der Pflanzenphysiologie, Vol. IV, 170; Editorial Springer, Berlín 1958; abreviado.

1.5 Los microorganismos al servicio del hombre

El profano reconoce la importancia práctica de los microorganismos en primer lugar en los perjuicios que causa al hombre, a los animales y a las plantas. De estos microorganismos causantes de enfermedades, o patógenos, y de sus características especiales se ocupa la Microbiología médica y veterinaria, así como la Fitopatología. Si bien los microorganismos se presentan como **perjudiciales** en otros campos de la naturaleza y de la industria, su papel como **beneficiosos** supera con mucho al anterior. Desde hace mucho tiempo los microorganismos se han ganado un sitio fijo en las economías domésticas y en la industria; no podemos pasar sin su capacidad de actuar como "plantas beneficiosas". Su utilización abarca desde la mejora de productos primarios agrícolas hasta la catálisis de pasos difíciles de reacciones químicas.

Procesos microbiológicos clásicos. Queda claro que los microorganismos pertenecen a las plantas de cultivo más antiguas considerando simplemente los ejemplos de la elaboración de la cerveza y vino mediante levaduras, la elaboración del pan y la preparación de productos lácteos con bacterias del ácido láctico, así como la elaboración de vinagre por bacterias del ácido acético. En Japón e Indonesia se preparan desde antiguo las semillas de soja con mohos. Exceptuando la producción de etanol, hace sólo sesenta años que se han introducido los microorganismos en la producción industrial de compuestos puros. Ya durante la primera guerra mundial se utilizó una fermentación controlada por levaduras para la producción de glicerina. Las grandes cantidades de ácido láctico y ácido cítrico que necesita la industria alimentaria se obtienen con la ayuda de bacterias lácticas o del moho *Aspergillus niger.* A partir de desechos ricos en hidratos de carbono, baratos, se obtiene acetona, butanol, 2-propanol, butanodiol, y otros compuestos químicos básicos a través de fermentaciones con clostridios y bacilos.

Producción de antibióticos. El hallazgo de los antibióticos ha iniciado una nueva época de la terapéutica médica y de la industria farmacéutica. Al descubrimiento de la penicilina y de otros productos de excreción de hongos, actinomicetos y de otras bacterias, debe la humanidad el disponer de medios casi infalibles para combatir las infecciones bacterianas. La búsqueda de nuevos antibióticos sigue teniendo éxito. Teóricamente parece también prometedora la lucha con ayuda de antibióticos de las enfermedades víricas y de los tumores provocados por virus.

Nuevos procesos microbiológicos. Las fermentaciones clásicas se complementan por nuevas producciones y transformaciones microbianas. Se obtienen carotenoides y esteroides mediante hongos. Desde el descubrimiento de que *Corynebacterium glutamicum* produce en gran cantidad ácido glutámico a partir de azúcar y sales de amonio, se han aislado mutantes y se han desarrollado procesos para obtener muchos aminoácidos, nucleótidos y productos bioquímicos a gran escala. El químico introduce microorganismos en la catálisis de procesos parciales de largas cadenas sintéticas; las transformaciones microbianas superan a las químicas en especificidad y rendimiento; a partir de cultivos de microorganismos se obtienen amilasas para la hidrólisis del almidón, proteinasas para trabajar el cuero, pectinasas para clarificar zumos de frutas, y otros enzimas de aplicación industrial.

Situación exclusiva de los microorganismos. Es de destacar que algunas de las materias primas disponibles, sobre todo en grandes cantidades, como el petróleo, el gas natural, o la celulosa, sólo pueden ser utilizadas por los microorganismos, y pueden ser transformadas en material celular (biomasa) o en productos intermedios, que son excretados por la célula. Los microorganismos ocupan por ello una posición monopólica en el "ennoblecimiento" de las materias primas no convencionales, tales como el petróleo, el gas natural y el carbón. La explotación de estas materias primas mediante procesos biológicos acaba de empezar.

Tecnología genética. La elucidación de los mecanismos de transferencia genética en las bacterias y la participación de elementos extracromosómicos han abierto posibilidades a la transferencia de DNA extraño a las bacterias. La manipulación genética permite introducir en bacterias pequeños fragmentos de información genética de un portador, por ejemplo, el hombre, para que éstas puedan sintetizar la proteína correspondiente. Es posible sintetizar hormonas, antígenos, anticuerpos y otras proteínas con ayuda de bacterias. Caracteres de resistencia, como por ejemplo frente a plagas de insectos (escarabajo de la patata) o de hongos, pueden transferirse a plantas de cultivo mediante manipulación genética. También se trabaja en la transferencia de la capacidad de fijar nitrógeno a plantas superiores. Por último, la tecnología genética ha hecho posible la producción de sondas de DNA con las que identificar fragmentos defectuosos, modificados, tanto en el DNA como en el RNA. La tecnología genética, cuyas herramientas proceden de las bacterias, conduce a una nueva era de la evolución biológica.

Aplicación directa de los conocimientos científicos básicos. Resultaría demasiado extenso mencionar aquí todos los procesos y productos de la Microbiología industrial, así como especular acerca de las posibilidades de otras aplicaciones. Las relaciones entre la investigación básica y la práctica son muy estrechas en Microbiología, lo mismo que en todas las Ciencias Naturales: *"Il n'y a pas des sciences appliquées... Mais il y a des applications de la science"* (PASTEUR).

1.6 Características generales de los microorganismos

La característica de los microorganismos que se expresa en su nombre es el pequeño tamaño del individuo. Las **pequeñas dimensiones** no constituyeron tan sólo el motivo primitivo de la separación de los microorganismos de las plantas y los animales, sino que tienen también consecuencias esenciales en lo que respecta a la morfología, la actividad, y la flexibilidad del metabolismo, de la expansión ecológica y de su manejo en el laboratorio.

Unidad de tamaño y relación superficie/volumen. El diámetro de la mayoría de las bacterias no es superior a la milésima de milímetro. La medida del microbiólogo es pues esta unidad de longitud: 1 micrómetro (micra) o $1\ \mu m = 10^{-3}$ mm; los datos acerca de la estructura fina se dan en nanómetros: $1\ nm = 10^{-3}\ \mu m = 10^{-6}$ mm. Las dimensiones de las cianobacterias pequeñas, levaduras y protozoos se mantienen también por debajo de los 10 μm. En estos organismos pequeños la relación de superficie con respecto al volumen es muy grande. Si se divide un cubo de 1 cm de arista (= 1 cm^3) en cubos que tengan 1 mm de arista, se obtienen 10^{12} cubos, cada uno de 1 μm^3. La superficie de estos cubos es 10 000 veces superior a la del cubo compacto; 1 mm^3 es el volumen de una célula bacteriana media.

La alta relación superficie/volumen tiene como consecuencia una gran interrelación con el entorno, y fundamenta también el elevado **intercambio de materia** de algunos microorganismos. La regla de superficie de RUBNERS (1893) dice que el gasto de energía de los animales en reposo no es proporcional a su masa, sino a su superficie. Si se extrapola el sentido de dicha regla al comportamiento de los tejidos y de las células pequeñas, tendrían que esperarse actividades metabólicas que se diferenciasen entre sí en varias potencias de diez. El estudio de la tabla 1.2 permite constatar

Tabla 1.2 Tasas respiratorias específicas de los microorganismos y de los tejidos (Q_{O_2} en µl de O_2 por mg de peso seco y por hora) y tiempo de generación (tiempo de duplicación) de las bacterias a su temperatura óptima de crecimiento.

Material biológico	Temp. (°C)	Q_{O_2}	Organismo	Temp. (°C)	Tiempo de generación (min)
Azotobacter	28	2000	*Bacilus megaterium*	40	22
Acetobacter	30	1800	*B. subtilis*	40	26
Pseudomonas	30	1200	*Escherichia coli*	40	21
Levadura del pan	28	110	*B. stearothermophilus*	60	11
			B. megaterium	70	13
Riñones e hígado	37	10-20	*B. coagulans*	70	14
			B. circulans	70	14
Raíces, hojas	20	0,5-4			

la dependencia esperada de la actividad metabólica, medida por el consumo de oxígeno, del tamaño de los tejidos y las células. También son proporcionalmente elevadas las tasas de crecimiento de los microorganismos. Al lector que esté preocupado por la alimentación de la creciente población humana debe interesarle que un buey de 500 kg produce en 24 horas unos 0,5 kg de proteína, mientras que 500 kg de células de levadura pueden producir en el mismo lapso de tiempo más de 50 000 kg de proteína.

Flexibilidad fisiológica. Las plantas y los animales superiores son relativamente rígidos en lo que se refiere a su equipo enzimático; el conjunto de enzimas cambia durante el desarrollo individual, pero se modifica poco si cambia el medio. En los microorganismos la flexibilidad metabólica es muy superior. Para las bacterias resulta necesario poseer una gran capacidad de adaptación, necesidad que puede atribuirse a sus reducidas dimensiones. Una célula de un micrococo sólo tiene espacio para unas 100 000 moléculas proteicas. Los enzimas no necesarios no pueden por tanto almacenarse. Algunos enzimas necesarios para la utilización de los nutrientes se producen únicamente cuando el nutriente se encuentra en el entorno de la célula. Los enzimas inducidos pueden suponer hasta el 10% del contenido proteico de la célula. Los mecanismos de regulación celular tienen pues en los microorganismos un papel considerablemente superior que en los demás seres vivos.

Expansión de los microorganismos. Las pequeñas dimensiones son también de importancia ecológica. Antes de que el hombre las propagase, muchas especies de plantas y animales se hallaban circunscritas a determinados continentes. Las bacterias y las cianobacterias son ubiquistas. Se encuentran en las regiones árticas, en el agua, y en los altos estratos de la atmósfera. La distribución de especies en todos estos hábitats es semejante a la que se presenta en los suelos. Debido a su poco peso, los microorganismos pueden difundirse con facilidad por corrientes de aire. Por ello, en condiciones naturales no hay ningún hábitat ni ningún sustrato que tenga que ser inoculado. Este hecho es el que se aprovecha con la técnica del **cultivo de enriquecimiento**. En general basta un gramo de suelo de un jardín para encontrar una bacteria que pueda utilizar una sustancia natural cualquiera. Hay microorganismos en todas partes; únicamente el medio decide cuál es el tipo que se reproducirá. Estableciendo las condiciones selectivas correspondientes en un tubo de ensayo se pueden enriquecer y aislar en cultivo puro la mayoría de los microorganismos conocidos a partir de una pequeña cantidad de tierra o de barro, o a partir de material procedente de otros hábitats en casos especiales.

Trabajo cuantitativo y avances de la investigación genética. Los métodos de cultivo en laboratorio de los microorganismos fueron desarrollados el siglo pasado por O. BREFELD y R. KOCK, y su escuela. La introducción de los medios de cultivo claros solidificados con gelatina o agar ha hecho posible el aislamiento de células individuales, seguir su crecimiento hasta colonias, y conseguir cultivos puros de las mismas. La estandarización de las técnicas estériles y de medios de cultivo ha permitido el desarrollo rápido de la Microbiología médica. A pesar de que KOCK ya describe métodos cuantitativos, no se han tomado realmente en consideración las ventajas del trabajo cuantitativo con microorganismos hasta los últimos cincuenta años. Las pequeñas dimensiones de los microorganismos permiten estudiar poblaciones de 10^8 hasta 10^{10} células en un tubo de ensayo o en una placa de Petri, y probar de este modo con medios escasos y en un espacio muy reducido, sucesos tan poco frecuentes como las mutaciones o las transferencias de características. Los enormes progresos de la investigación bioquímica y genética no hay que agradecerlos en último lugar al fácil manejo de las bacterias.

2. La célula y su estructura

El esclarecimiento de la constitución y la estructura fina de la célula estuvo restringido a los **métodos ópticos**, y al aumentar el poder de resolución de los instrumentos ópticos y al mejorar las técnicas de la microscopía, aumentaron también los conocimientos que se tenían de la micromorfología de la célula y sus componentes. En el desarrollo posterior de la microscopía óptica, a través de la ultravioleta, hasta la microscopía electrónica, disminuyó considerablemente el límite de resolución; gracias a la microscopía de campo oscuro y de contraste de fases se facilitó la observación de células vivas. Los métodos microscópicos, sobre todo de microscopía electrónica, que utiliza métodos difíciles para la preparación de los materiales biológicos, son aún hoy en día imprescindibles. Otros **métodos físicos** y **químicos** indirectos para aislar y caracterizar los componentes celulares, ofrecen la complementación necesaria al nivel molecular.

A partir de homogenados celulares se separaron mediante centrifugaciones diferenciales los distintos orgánulos y fracciones, para luego estudiarlos bioquímicamente. La rápida elucidación de la estructura y función de los orgánulos y otros componentes celulares se debe a la combinación de métodos ópticos y bioquímicos. Estas investigaciones han permitido reconocer que los procariotas y los eucariotas se diferencian entre sí por un gran número de propiedades.

Todas las células constan de un citoplasma y un material nuclear. Queda separada del exterior por una membrana citoplasmática. Este protoplasto puede estar rodeado por una pared celular, que cumple predominantemente con funciones mecánicas; éste es el caso de las células vegetales y de la mayoría de las bacterias.

A continuación se presentarán brevemente las características básicas de la célula de los eucariotas (eucito) y de la célula de los procariotas (protocito). La célula vegetal embrionaria puede servir como representante del eucariota (Fig. 2.1).

2.1 La célula eucariota

El núcleo. La estructura del núcleo y el tipo de división nuclear son las características más sobresalientes y básicas por las que se diferencian la célula eucariota de la procariota (Fig. 2.2). El núcleo (interfásico) está

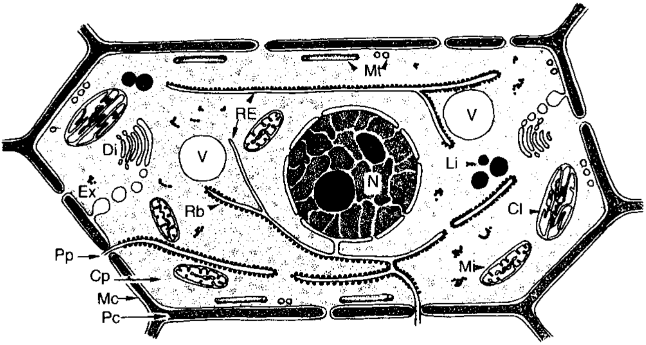


Fig. 2.1 Esquema combinado de un corte longitudinal de una célula eucariótica (célula vegetal) (según Sitte). Cl = cloroplastos, Mc = membrana citoplasmática, Cp = citoplasma, Di = dictiosomas, RE = retículo endoplasmático, Ex = vesículas de secreción (exocitosis), Li = gotas lipídicas, Mi = mitocondrias, Mt = microtúbulos, N = núcleo, Rb = ribosomas, Pp = puntuaciones con plasmodesmos, V = vacuolas, Pc = pared celular.

rodeado por la **membrana nuclear**, una **membrana** de dos capas y con poros. El DNA, que constituye el material hereditario (genoma) está repartido en un número de subunidades, los **cromosomas**; éstos sólo se hacen visibles durante la división nuclear. La división del núcleo tiene lugar en la **mitosis** (Fig. 2.2); ésta cumple con dos funciones: la duplicación exacta del material genético, que en último término se visualizará como una división longitudinal y duplicación de los cromosomas, y la distribución en cada uno de los núcleos hijos de las dos dotaciones cromosó-

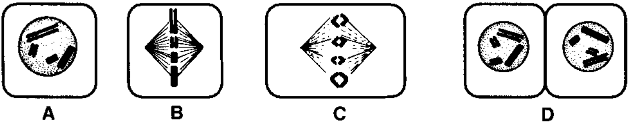


Fig. 2.2 Esquema de la mitosis de una célula diploide. El núcleo contiene parejas de cromosomas, de las que cada uno procede de un progenitor (dibujado en rojo y en negro). Mediante la mitosis los cromosomas se distribuyen por igual entre ambas células hijas: **A** en la profase se hacen visibles los cromosomas ya divididos longitudinalmente y se disuelve la membrana del núcleo; **B** en la metafase los cromosomas se ordenan en la placa ecuatorial; **C** en la anafase cada uno de los cromosomas resultantes de la división es arrastrado por los filamentos del huso hacia los polos de la célula; **D** en la telofase los cromosomas recién divididos son rodeados de una membrana nuclear y el núcleo vuelve a adoptar la forma funcional.

micas completas. Aún no está clara la forma en la que se produce esta duplicación. La distribución de los cromosomas puede seguirse con el microscopio óptico, y se conoce desde hace tiempo. Mientras que el núcleo interfásico aparece al microscopio óptico como una masa no estructurada, en las fases de división los cromosomas se acortan y se hacen visibles. Se disponen en un plano (plano ecuatorial); las mitades longitudinales de los cromosomas se separan mediante un aparato contráctil, el huso acromático. El huso desaparece, los cromosomas se hacen invisibles, y los núcleos hijos se rodean de nuevo por una membrana nuclear.

Todos los animales y plantas superiores sufren durante la reproducción sexual un cambio de fase nuclear. Durante la fecundación las células germinales o gametos y sus núcleos se fusionan para formar el **zigoto.** El núcleo masculino y el femenino aportan en la fecundación el mismo número de cromosomas (n). El núcleo del zigoto contiene por lo tanto dos dotaciones cromosómicas o genomas ($2n$). Mientras que los gametos son **haploides** (una dotación) las células somáticas son **diploides** (dos dotaciones). En el paso de una generación a la siguiente tiene pues que llevarse a cabo una reducción del número normal ($2n$) a la mitad (n). Esta reducción cromosómica se denomina **meiosis** o **división reduccional** (Fig. 2.3). La meiosis es un proceso básico en los organismos que se reproducen sexualmente; cumple con dos misiones: la nueva combinación de las unidades hereditarias (genes) paternas y maternas, y la reducción del número de cromosomas. La meiosis se inicia por un apareamiento de los cromosomas: cada cromosoma se aparea con el correspondiente del otro progenitor (homólogo). En este estado puede producirse por ruptura y reunión cruzada (crossing over o entrecruzamiento) un intercambio de porciones de igual longitud entre cromosomas homólogos. Finalmente se produce una doble división (formación del huso) de los cromosomas apareados, con el resultado de que aparecen cuatro células, cada una con un

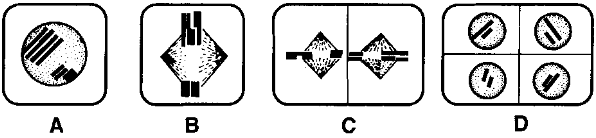


Fig. 2.3 Representación esquemática de la meiosis. La meiosis produce la recombinación de los genes paternos y maternos (dibujados en rojo y en negro) y provoca la reducción del número de cromosomas. **A** En primer lugar se produce el apareamiento de los cromosomas homólogos; **B** mediante entrecruzamiento se ha producido un intercambio entre segmentos de los cromosomas homólogos y por la formación consecutiva de dos husos (**B** y **C**) se separan los cromosomas, con lo que quedan separados los cromosomas homólogos (**C**); **D** han surgido cuatro células con núcleos haploides.

núcleo haploide. En el curso de la meiosis no se produce, por tanto, únicamente una reordenación de los cromosomas procedentes del padre y de la madre, sino que también puede tener lugar un intercambio de segmentos entre cromosomas homólogos. Ambos procesos conducen a una nueva combinación (recombinación) de los genes.

En muchas plantas inferiores, incluidas las algas y los protozoos, la reducción cromosómica se produce tras la formación del zigoto, de forma que el organismo es haploide. En las plantas con alternancia de generaciones heterofásica (antitética; musgos, helechos) se alterna una generación haploide con otra diploide.

Los cromosomas de los eucariotas están formados por fibras de DNA con numerosas proteínas. Parte de estas proteínas son histonas, proteínas básicas. DNA e histonas están asociados en un estado altamente ordenado aparentemente, y forman los nucleosomas. Estos nucleosomas son las subunidades de los cromosomas.

El RNAm se forma en el núcleo con el DNA cromosómico. Se transporta al citoplasma a través de los poros que se encuentran en la membrana nuclear. En el núcleo interfásico puede verse un nucleolo, que contiene el DNA nucleolar. Éste lleva la información para el RNA ribosómico, y probablemente también para el RNAt. Ambos ácidos ribonucleicos se sintetizan en el nucleolo e igualmente se transfieren al citoplasma. En las células embrionales o en los ovocitos hay varios o muchos nucleolos.

En la célula eucariota el núcleo es el portador más importante de información genética, pero no es el único. Parte de la información se encuentra en el DNA de las mitocondrias y de los cloroplastos.

El citoplasma. El protoplasto está separado del exterior por la membrana citoplasmática. En la célula eucariota es característica la acusada división del citoplasma en una serie de recintos de reacción. Esta compartimentación se debe en parte a invaginaciones de la membrana citoplasmática, con formación de cisternas y vesículas; además, en el citoplasma eucariota se encuentran mitocondrias y (en las plantas) también cloroplastos, que están totalmente rodeados por membranas.

La membrana citoplasmática se continúa hacia el interior en el retículo endoplasmático (RE). Una parte del RE forma la membrana nuclear y rodea al núcleo; la membrana nuclear tiene poros, que permiten un transporte sin obstáculos de ácidos nucleicos, proteínas y metabolitos entre el núcleo y el citoplasma. Una parte del RE tiene ribosomas y se denomina RE granular o rugoso. Los ribosomas son el lugar de la síntesis proteica. Los ribosomas libres o fijados al RE son del tipo 80S.

Un orgánulo membranoso específico de las células animales es el aparato de Golgi; orgánulos semejantes de las células vegetales se denominan dictiosomas. Constan de paquetes de vesículas membranosas planas llamadas cisternas. El aparato de Golgi y los dictiosomas se emplean en la secreción, sobre todo de enzimas. Los enzimas se sintetizan en las cisternas y se almacenan en ellas. Finalmente se libera una vesícula, se desplaza hacia la membrana citoplasmática, se fusiona con ella, y libera su contenido hacia el exterior. Este proceso se denomina exocitosis.

Mitocondrias y cloroplastos. La célula eucariota contiene otros dos orgánulos rodeados por membranas: las mitocondrias y los cloroplastos. Las mitocondrias tienen función respiratoria; son estructuras ricas en lípidos de forma variable, y constan de dos membranas: una externa y otra interna intensamente plegada (crestas o túbulos). La membrana interna contiene a los componentes de la cadena de transporte de electrones y a la *ATP-sintasa.* Las células de las algas y las plantas verdes tienen cloroplastos además de mitocondrias. Las membranas internas de los cloroplastos (tilacoides) contienen los pigmentos fotosintéticos y los componentes del transporte de electrones fotosintético.

Endocitosis. Es característica de la célula eucariota la capacidad de captar nutrientes líquidos o sólidos. La captación de partículas sólidas es conocida como la fagocitosis, por ejemplo en leucocitos sanguíneos o en amebas. Si se trata de la asimilación de nutrientes líquidos se habla de pinocitosis. Los dos tipos de captación de material extracelular se reúnen bajo el de endocitosis.

La capacidad de los eucariotas de englobar en la célula partículas sólidas –entre ellas también células vivas– es de un significado biológico básico. En la endocitosis se puede ver la premisa y el mecanismo para el establecimiento de una endosimbiosis. Normalmente la partícula englobada por una ameba en el curso de la fagocitosis es digerida y lisada totalmente. En algunos casos puede darse, no obstante, una simbiosis intracelular. El ejemplo más conocido de endosimbiosis de este tipo es la simbiosis de las leguminosas con rizobios en los nódulos de las raíces (pág. 442). Este tipo de endosimbiosis está ampliamente distribuido entre los eucariotas (véase pág. 593). La capacidad de las células eucariotas para la endocitosis apoya también la teoría endosimbiótica del origen de los cloroplastos y las mitocondrias. Los procariotas son incapaces de realizar una endocitosis.

La hipótesis endosimbiótica. Los orgánulos celulares de los eucariotas tienen muchas características básicas comunes con los procariotas; contienen una molécula de DNA circular y cerrado, sus ribosomas son del tipo 70S, su membrana citoplasmática contiene los componentes de la cadena de transporte de electrones (flavinas, quinonas, proteínas sulfoférricas, y citocromos), y cumple con la función de obtener energía, por respiración o por fotosíntesis. Según la hipótesis endosimbiótica las mitocondrias proceden de bacterias aeróbicas incoloras y los cloroplastos de cianobacterias, que entraron en una relación endosimbiótica con la célula eucariota primitiva. A continuación tuvo que establecerse una especialización de muy alto grado; la función regeneradora de ATP se delegó a los orgánulos celulares; la membrana que rodea al protoplasto del eucariota no dispone de los componentes de la cadena de transporte de electrones. Por otra parte, los orgánulos celulares no son independientes; a pesar de contener su propia molécula de DNA, una parte importante de la información genética necesaria para la síntesis de sus proteínas se localiza en el núcleo del eucariota. Como ejemplo citemos aquí la *ribulosa-bifosfato carboxilasa*, el enzima clave de la fijación autotrófica de las plantas verdes. Consta de 8 subunidades grandes y de 8 subunidades pequeñas. La información de las subunidades grandes se localiza en el DNA del cloroplasto, la de las pequeñas está en el núcleo celular. Por ello, los orgánulos no pueden hacerse crecer fuera de la célula eucariota, y la hipótesis endosimbiótica no es comprobable.

Orgánulos de locomoción. Siempre que aparecen flagelos o cilios en los eucariotas, como en protozoos, algas, espermatozoides o epitelios vibratorios, presentan la misma estructura. La sección transversal permite reconocer una estructura con nueve filamentos dobles periféricos y dos filamentos sencillos centrales ("modelo 9 + 2"). Están rodeados por la membrana citoplasmática. Los flagelos se hallan fijados a la capa externa del citoplasma por un corpúsculo basal o blefaroplasto; éste procede a su vez de un orgánulo que se autoduplica, el centriolo.

2.2 La célula procariota

La estructura de la célula procariota será ampliamente discutida. Antes de entrar en detalle, debemos resumir los caracteres esenciales por los que la célula procariota se diferencia de la eucariota. Tal como se ha indicado anteriormente, las células de los procariotas son muy pequeñas. El mayor número de bacterias tiene forma de bacilo, que no es más de 1 μm de ancho ni 5 μm de largo. Muchos pseudomonas tienen un diametro de 0,4 a 0,7 μm, y una longitud de 2 a 3 μm. El diámetro de los micrococos es sólo de 0,5 μm. Existen pocos gigantes entre las bacterias (*Chromatium okenii*, *Thiospirillum jenense*, *Achromatium*, etc.). Estas bacterias gigantes son siempre de crecimiento relativamente lento.

La compartimentación celular es claramente menos acusada que en el eucariota (Fig. 2.4). Ni el DNA está rodeado por una membrana nuclear ni se presentan orgánulos del tipo de las mitocondrias o los cloroplastos. La región nuclear, que en un corte ultrafino aparece al microscopio electrónico

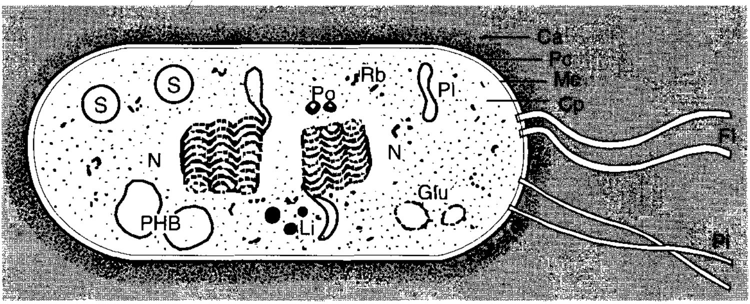


Fig. 2.4 Esquema de un corte longitudinal de una célula procariótica (célula bacteriana). Mc = membrana citoplasmática, Cp = citoplasma, Fl = flagelo, Glu = glucógeno, Ca = cápsula, Li = gota lipídica, N = núcleo, PHB = ácido poli-ß-hidroxibutírico, Pi = pili, Pl = plásmido, Po = gránulo de polifosfato, Rb = ribosomas y polisomas, S = inclusiones de azufre, Pc = pared celular.

como una red de finas fibras, está en contacto con el citoplasma lleno de ribosomas (Fig. 2.5). La membrana citoplasmática se continúa en muchas bacterias hacia el interior del protoplasto (membrana intracitoplasmática). La membrana citoplasmática es el lugar de obtención de energía por respiración o por fotosíntesis, esto es, de funciones que en la célula eucariota se localizaban en las membranas de las mitocondrias y de los cloroplastos.

Los ribosomas de los procariotas son menores que los ribosomas citoplasmáticos de los eucariotas; son del tipo 70S.

Toda la información genética del procariota se encuentra en un solo filamento de DNA, el cromosoma bacteriano. Esta molécula de DNA se presenta en las bacterias investigadas hasta ahora como una hebra circular y cerrada; su contorno mide de 0,25 a 3 mm. No hay histonas. En muchas bacterias se ha encontrado DNA extracromosómico; son moléculas de DNA pequeñas, igualmente circulares y cerradas, que se denominan plásmidos. La información localizada en los plásmidos no es imprescindible.

Las bacterias se multiplican generalmente por división binaria. Tras el alargamiento de la célula construyen de fuera hacia dentro paredes transversales que van progresando, y las células hijas se separan. Sin embargo, muchas bacterias, en condiciones ambientales determinadas, permanecen unidas en grupos característicos después de la división durante un cierto tiempo. Según el plano de división y el número de divisiones pueden diferenciarse, por ejemplo, en las bacterias esféricas, parejas (*diplococos*), cadenas (*estreptococos*), placas o paquetes (*sarcina*). También los bacilos se presentan en parejas o cadenas. La reproducción por gemación constituye la excepción dentro de los procariotas. La duplicación de la célula va

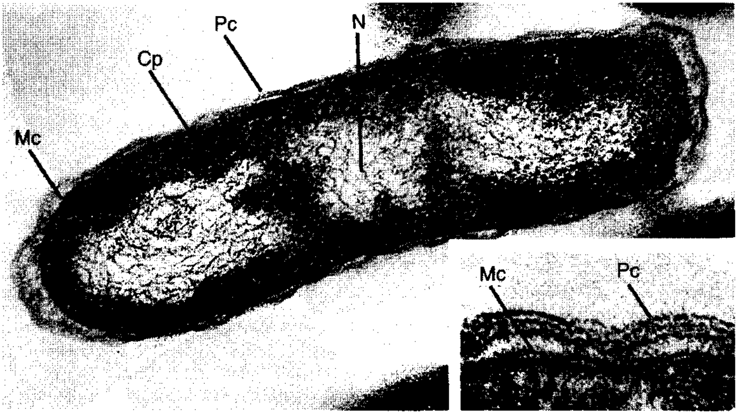


Fig. 2.5 Micrografía electrónica de un corte ultrafino de *Escherichia coli* B. Debido a una ligera plasmólisis el protoplasto se ha separado un poco de la pared celular; a causa de eso pueden reconocerse bien la pared celular (Pc) y la membrana citoplasmática (Mc). Cp = citoplasma con ribosomas, N = núcleo. Aumento de toda la célula 56 200 veces, del fragmento de célula, 216 000 veces. (Micrografías de H. Frank, Max-Planck-Institut de investigación sobre virus, Tübingen.)

precedida por la duplicación o replicación del cromosoma bacteriano. Por tanto, una fase diploide se restringe a un estadio muy corto del ciclo de división celular. Los procariotas son, por ello, haploides.

Las células de los procariotas están rodeadas, con muy pocas excepciones (*Mycoplasma*), por una pared celular. Su estructura básica es el glucopéptido o mureína. Se trata de un heteropolímero característico de los procariotas, y que no se presenta en los eucariotas.

Muchos procariotas son móviles, bien por natación o por reptación. Los orgánulos de locomoción de las bacterias que se desplazan por natación son los flagelos bacterianos. El flagelo tiene una constitución considerablemente más sencilla que la de los eucariotas, y está formada por una sola fibrilla.

Según la forma, todas las bacterias pueden reducirse, salvo escasas excepciones, a una esfera, un cilindro o un cilindro curvado. Como formas básicas hay que distinguir entre cocos y bacilos rectos o curvados (Fig. 2.6). Como bacilos rectos aparecen al microscopio los miembros de los géneros *Pseudomonas* y *Bacillus*. Los espirilos tienen la forma de una espiral o helicoidal. Se llama *Vibrio* a un bacilo curvado. Algunas modificaciones de estas formas básicas son características para algunas bacterias. La forma de maza y la tendencia a cambiar de forma es característica del

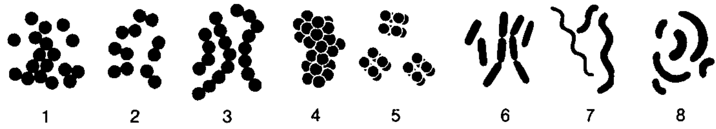


Fig. 2.6 **Forma de las bacterias unicelulares:** **1** micrococos, **2** diplococos, **3** estreptococos, **4** estafilococos, **5** sarcinas, **6** bacilos, **7** espirilos, **8** vibriones.

género *Corynebacterium* y de las bacterias corineformes. En muchas especies del género *Mycobacterium* se presentan ramificaciones incipientes de la célula. Los estreptomicetos llegan a formar incluso un micelio, semejante al de los hongos, pero se diferencia de éstos por el menor diámetro celular (< 1 µm frente a > 5 µm).

Composición química de los seres unicelulares. El peso húmedo (masa húmeda) de los seres unicelulares se determina mediante centrifugación y separación del medio de cultivo. La masa celular sedimentada tiene un contenido en agua del 70 al 85%; el peso seco (masa seca) supone, por tanto, del 15 al 30% del peso húmedo. Si las células contienen grandes cantidades de materiales de reserva (es decir, lípidos, polisacáridos, polifosfatos o azufre) el peso seco es proporcionalmente superior. La materia seca de las bacterias (expresada en porcentaje del peso seco) está compuesta principalmente por polímeros: proteína 50, pared celular 10-20, RNA 10-20, DNA 3-4 y lípidos 10. Los diez bioelementos están aproximadamente en las siguientes proporciones (en porcentaje): carbono 50, oxígeno 20, nitrógeno 14, hidrógeno 8, fósforo 3, azufre 1, potasio 1, calcio 0,5, magnesio 0,5 y hierro 0,2.

2.2.1 El núcleo bacteriano

Las pequeñas dimensiones de la célula bacteriana y la presencia de dos tipos de ácidos nucleicos han dificultado mucho la demostración citoquímica del núcleo bacteriano. A pesar de todo, los métodos citológicos clásicos, y posteriormente la técnica de los cortes ultrafinos junto con la microscopía electrónica, han conducido al reconocimiento de que las bacterias contienen DNA, de que este DNA no está distribuido de forma difusa en el citoplasma, sino que está localizado en regiones o zonas discretas, y de que estas zonas se dividen antes de la división celular.

Una descripción más precisa de la estructura de los núcleos bacterianos ha sido posible mediante la microscopía electrónica de cortes ultrafinos. Para obtener una reproducción óptima de la ultraestructura del núcleo considerada como natural, fue decisiva una fijación correcta (con tetróxido de osmio, acetato de uranilo o ácido fosfotúngstico) en condiciones muy determinadas. En cortes finos a través de la región nuclear no ha podido demostrarse nunca una membrana nuclear, aunque la región nuclear puede distinguirse como una zona central, relativamente transparente comparada con el citoplasma, más denso a los electrones, con sus ribosomas claramente contrastados. En cortes finos con una fijación óptima se reconoce al cromosoma como una estructura altamente ordenada con bandeados periódicos (Fig. 2.7A). Por lo menos parcialmente, el cromosoma está anclado a la membrana citoplasmática. Una representación aproximada del estado altamente ordenado del cromosoma bacteriano se da en la figura 2.7B.

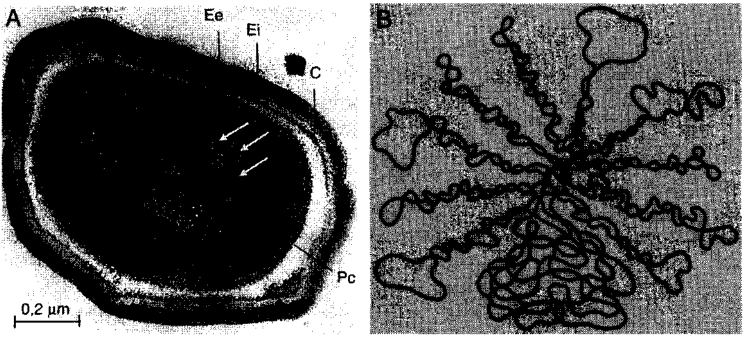


Fig. 2.7 El cromosoma bacteriano. A El cromosoma se encuentra en un estado altamente ordenado, condensado, tal como se reconoce en esta espora de la bacteria *Bacillus megaterium* que está germinando (Ee, cubierta externa de la espora; Ei, cubierta interna de la espora; C, córtex; Pc, pared celular. Fotografía de P. Giesbrecht, Berlín). **B** Representación esquemática del cromosoma aislado y extendido de una célula lisada. La mayoría de los lazos se encuentran en un estado ordenado ("supercoiled"). En los dominios inferiores la doble hélice se encuentra en un estado totalmente relajado, debido a la rotura de una de las cadenas, lo que posibilita una rotación libre.

Autorradiografía. Cairns demostró por primera vez mediante autorradiografía de preparaciones de células cultivadas con timidina marcada con tritio, que el material nuclear está formado por DNA y que en *Escherichia coli*, por ejemplo, adopta la forma de un solo filamento, circular y cerrado, de aproximadamente 1 mm de longitud. El DNA es la única sustancia celular que contiene timina. Si se lisan sobre un filtro de membrana estas células con timina marcada, mediante el tratamiento con *lisozima* o laurilsulfato, el cromosoma bacteriano se extiende y puede visualizarse por autorradiografía. Los autorradiogramas (Fig. 2.8) son una prueba impresionante de que el DNA bacteriano se presenta como un filamento circu-

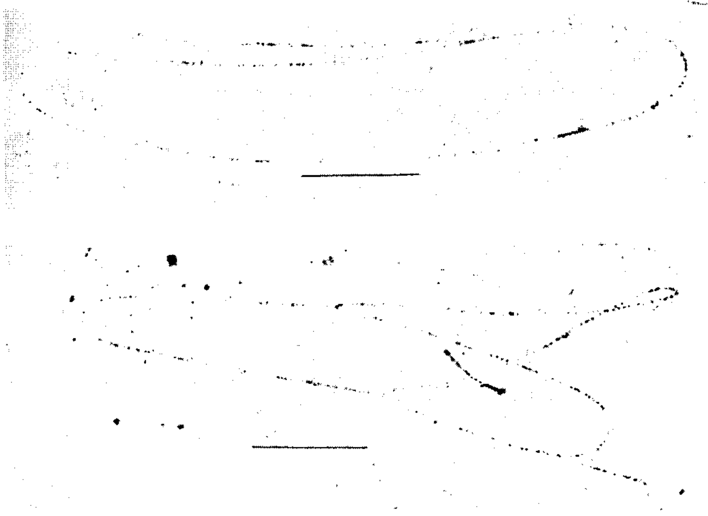


Fig. 2.8 Autorradiograma de cromosomas de *Escherichia coli* en vías de división. Las células habían crecido durante dos generaciones en presencia de timidina tritiada y fueron lisadas con lisozima; aclaraciones en el texto (de Bleecken, S., G. Strohbach, E. Sarfert: Z. allg. Mikrobiol. 6 [1966] 121).

lar cerrado. Este filamento representa un grupo de ligamiento en sentido genético, y se denomina cromosoma bacteriano. Los autorradiogramas indican ya como tiene que imaginarse la división del cromosoma. En la figura 2.9 se representa el DNA de un bacteriófago mediante otro método de preparación.

Estructura del DNA. El ácido desoxirribonucleico (DNA) es una macromolécula. Por hidrólisis ácida puede separarse en sus componentes: **desoxirribosa**, **ácido fosfórico** y **bases**, que se encuentran en la misma relación. El DNA contiene cuatro bases distintas, dos púricas (adenina y guanina) y dos pirimidínicas (citosina y timina).

Si se hidroliza el DNA con ayuda de nucleasas (*DNasa* pancreática I o *diesterasa* de veneno de serpiente) se liberan nucleótidos 3' o 5'. Estos desoxinucleótidos se hallan unidos para formar largas cadenas de ácidos nucleicos. El DNA contiene alternativamente una pentosa y un ácido fosfórico; el azúcar se une a una de las cuatro bases. Una cadena de nucleótidos de este tipo tiene un sentido determinado; se dice que es pclar. En un lado se encuentra un grupo fosfato en posición 5' y en el otro un hidroxilo libre en posición 3'.

Fig. 2.9 Moléculas de DNA del bacteriófago PM2. Se han captado moléculas de DNA en dos estados distintos. Los ovillos están formados por DNA ccc (covalente, cerrado y circular). Por irradiación con UV algunas moléculas de DNA se han roto en una de sus hebras y se ha formado DNA oc ("open circular", abierto y circular) que aparecen como anillos grandes con un contorno de 3,02 µm. El DNA queda expandido por un compuesto de amonio cuaternario (BAC) y se ha contrastado positivamente con acetato de uranilo. Microfotografía electrónica en campo oscuro sobre una película de carbón (U. HAHN, Göttingen).

Ya en 1950 CHARGAFF presentó una serie de reglas. La adenina y la timina por una parte, y la guanina y la citosina por otra se encuentran en iguales cantidades respectivamente (A = T, G = C). La suma de las bases púricas es igual a la suma de las bases pirimidínicas. La relación de bases (G + C)/(A + T) puede variar de una especie a otra dentro de unos márgenes amplios, pero es constante para cada especie.

La disposición de los componentes básicos en esta macromolécula de alto peso molecular, esto es, la estructura secundaria del DNA, se resolvió mediante el **análisis por rayos X**. Si se separa el DNA en forma de filamento, se le hace girar bajo un haz de rayos X monocromático y se capta la luz refractada en una película, se obtiene un diagrama estructural de rayos X. Los diagramas de DNA de distintas procedencias (esperma, timo, bacterias, bacteriófagos) resultaron casi idénticos. La interpretación por WILKINS de estos diagramas de difracción de rayos X dio como resultado que los anillos púricos y pirimidínicos se disponían en ángulo recto con respecto al eje longitudinal del filamento polinucleotídico. El filamento tenía que estar arrollado en espiral en torno al eje central con un paso de rosca de 3,4 nm. Por la densidad podía suponerse que se presentaba más de un filamento.

WATSON y CRICK (1953) reunieron estos hallazgos en la brillante teoría de la estructura del DNA. Según el modelo de WATSON y CRICK los filamentos polinucleotídicos forman una doble hélice alrededor de un eje imaginario. Los dos filamentos están unidos por puentes de hidrógeno, que se forman entre las bases orientadas hacia el interior (Fig. 2.10). Para mantener las distancias y las relaciones de apareamiento, cada adenina tiene que aparearse con una timina, y cada citosina con una guanina. Cada vuelta de la hélice contiene unos 10 pares de bases. La sucesión de bases en los dos

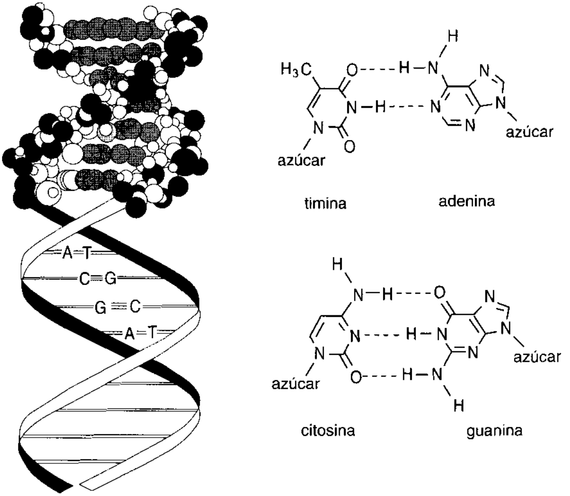


Fig. 2.10 Estructura del ácido desoxirribonucleico (DNA). Las hebras del DNA se mantienen unidas a través de puentes de hidrógeno. A la izquierda está la doble hélice de DNA, representada en la parte superior mediante un modelo de esferas y en la inferior las bases representan los escalones de una escalera de caracol. A la derecha se representan los apareamientos de bases entre adenina y timina, y entre guanina y citosina; las líneas a trazos simbolizan los puentes de hidrógeno.

filamentos tiene que ser complementaria. Los dos filamentos son antiparalelos (enlace 5'→ 3', 3'→ 5'). La longitud del cromosoma de *E. coli* es de 1,4 mm. 1 μm de DNA bicatenario tiene un peso relativo de $2{,}07 \cdot 10^6$ o 3000 pares de bases (también llamado 3 kilobases [kb]). El cromosoma de *E. coli* tiene pues un peso relativo de $2{,}9 \cdot 10^9$.

Los **puentes de hidrógeno** que unen A con T, y G con C no son igualmente fuertes. Los enlaces por puente de hidrógeno son predominantemente de naturaleza electrostática. Se forman por grupos OH^- y NH_2^-. O y N son elementos fuertemente electronegativos; por ello atraen a los electrones y determinan que el hidrógeno enlazado tenga una carga positiva. El átomo de H con carga positiva puede entonces ser atraído por otros grupos electronegativos que tengan pares de electrones libres y formar así un puente de hidrógeno. La fuerza del puente de hidrógeno puede relacionarse con la acidez del átomo de hidrógeno y la basicidad del átomo aceptor. Los puentes de hidrógeno son más fuertes que las fuerzas intermoleculares de VAN DER WAALS; la energía de enlace puede ser hasta de 38 kJ (9 kcal)/mol; en promedio no son mucho mayores que la energía térmica existente a 37°C. Tal como muestra la figura 2.10 entre guanina y citosina se establecen tres, y entre timina y adenina dos puentes de hidrógeno. Como consecuencia de la reducida energía de enlace un incremento de la temperatura, una pequeña modificación en la concentración de magnesio o la adición de urea pueden conducir ya a la alteración o disolución del enlace. Aumentando la temperatura se rompen los puentes de hidrógeno y se separan los dos filamentos polinucleotídicos. Esta destrucción de la estructura secundaria va acompañada de un incremento en la absorción de luz (a una longitud de onda de 259 nm; hipercromicidad). La temperatura a la que se consigue la mitad de la extinción máxima incrementada se denomina T_m. La temperatura a la que se consigue esta alteración es tanto mayor cuanto mayor sea el contenido en puentes de hidrógeno triples entre las bases guanina y citosina. La determinación de esta temperatura de alteración ("punto de fusión", T_m) para un DNA aislado y purificado (Fig. 2.11B) constituye pues un medio fácil de determinar la proporción relativa de citosina y guanina en un DNA. El contenido en GC indica la relación de moles de las bases guanina, citosina, adenina y timina en un DNA (en porcentaje).

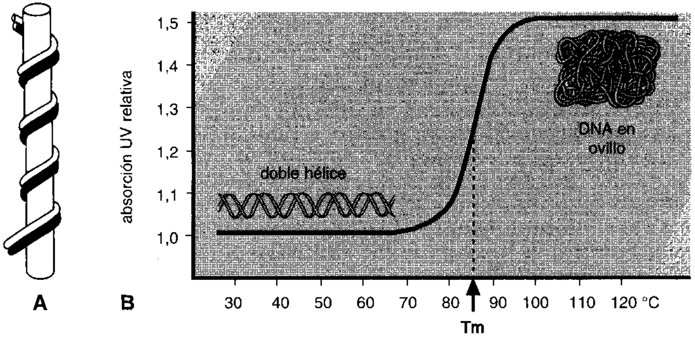


Fig. 2.11 **A** Puede establecerse el **modelo de una doble hélice plectonémica** arrollando dos cables contiguos alrededor de un bastón y sacando a continuación el bastón. Cada uno de los filamentos depende del otro y sólo puede separarse de él desarrollándolos; **B Curva de fusión del DNA bacteriano**. T_m nos da la temperatura a la que se alcanza la mitad de la extinción máxima.

Con respecto a su contenido en GC las bacterias se diferencian entre sí en un margen muy amplio. Los valores van desde el 30% de algunos estafilococos y del grupo *Cytophaga*, hasta más del 70% en representantes del género *Micrococcus*, y algunas mixobacterias con cuerpos fructíferos. El contenido en GC es característico de las especies y se considera como característica taxonómica.

Replicación del DNA. El DNA contiene la información genética de la célula. La división y duplicación del DNA, que precede siempre a la división celular, ha de conducir por tanto a dos cromosomas totalmente idénticos. Visto superficialmente la multiplicación del DNA, la duplicación o replicación del DNA, es muy sencilla. Los dos filamentos sólo necesitan separarse, y a continuación los nucleótidos con las bases complementarias se enfrentan a cada uno de los filamentos polinucleotídicos y se unen entre sí. Una de las dificultades principales surge ya al intentar imaginarse cómo se realiza la separación de los dos filamentos. Según el diagrama de rayos X el DNA es una doble hélice plectonémica, y no paranémica (véase la Fig. 2.11A).

Para comprobar si la desespiralización tiene que ser aceptada se emitieron tres posibilidades básicas de la replicación del DNA como hipótesis heurísticas (Fig. 2.12; Delbrück y Stent, 1957):

1. *Mecanismo conservativo*: No tiene lugar una desespiralización; la hélice paterna sirve como matriz para la síntesis de dos nuevas. La doble hélice hija se sintetiza de material totalmente nuevo. La hélice paterna se mantiene como tal.

2. *Mecanismo dispersivo*: La hélice paterna se rompe repetidas veces en la replicación a cada media vuelta; la nueva síntesis se lleva a cabo en los fragmentos, que se vuelven a reunir de forma cruzada. Cada filamento polinucleotídico está pues formado por material viejo y nuevo.

3. *Mecanismo semiconservativo*: La doble hélice paterna se desespiraliza y en cada filamento polinucleotídico se forma otro complementario. La hélice nueva es pues un híbrido entre un filamento viejo y otro de nueva síntesis.

Para diferenciar entre estas posibilidades Meselson y Stahl desarrollaron unos experimentos de marcado y separación posterior del DNA marcado en gradientes de densidad (Fig. 2.13).

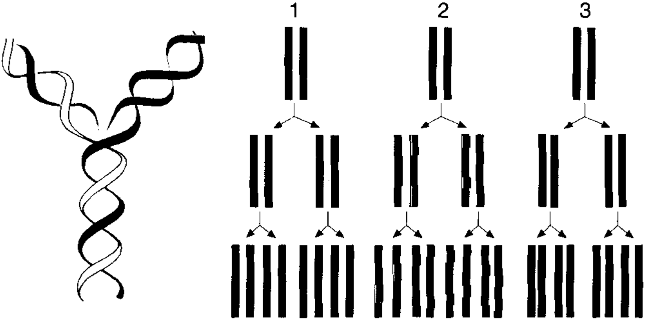


Fig. 2.12 Modelo de replicación del DNA de acuerdo con el mecanismo semiconservativo. Se representan esquemáticamente las tres **posibles formas** principales de **replicación del DNA: 1** mecanismo conservativo; **2** mecanismo dispersivo; **3** mecanismo semiconservativo. Para aclaraciones consúltese el texto.

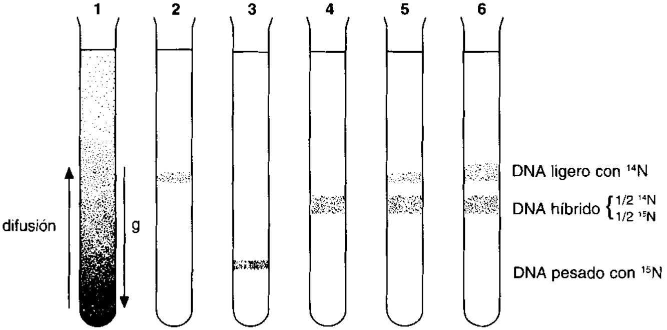


Fig. 2.13 Reduplicación semiconservativa del DNA. Resultados del experimento de MESELSON-STAHL. Se obtuvo la separación del DNA marcado con ^{15}N y ^{14}N centrifugando en un gradiente de densidad de ClCs 6 M. **1** El gradiente de densidad constituye el resultado de equilibrar las fuerzas de difusión y de la gravedad; **2** DNA de células normales cultivadas con $Cl^{14}NH_4$; **3** DNA de células cultivadas durante varias generaciones con $Cl^{14}NH_4$; **4** DNA de células marcadas con ^{15}N que han sido cultivadas durante una generación con $Cl^{14}NH_4$; **5** DNA de células marcadas con ^{15}N que han sido cultivadas durante dos generaciones con $Cl^{14}NH_4$; **6** DNA de células marcadas con ^{15}N que han sido cultivadas durante tres generaciones con $Cl^{14}NH_4$.

Si se centrifuga una disolución de cloruro de cesio (6 molar) muchas horas a 100 000 *g*, se establece un gradiente de densidad de ClCs (equilibrio entre gravedad y difusión). Si esta disolución contiene DNA, éste se concentra en una zona, cuya situación en el gradiente corresponde a su peso específico. El DNA obtenido de bacterias que han crecido con $Cl^{15}NH_4$ es un 0,8% más pesado que el ^{14}N-DNA normal. Forma por tanto una banda separada en el gradiente de ClCs. Se cultivó *E. coli* durante varias generaciones con ^{15}N como fuente de N, de forma que el DNA sólo contenía ^{15}N. A continuación se añadió al medio ^{14}N en exceso. Se tomaron muestras antes y después de esta adición, se extrajo el DNA y se analizó en gradientes de ClCs. Después de una división en el medio con ^{14}N todo el DNA se había vuelto "semipesado" (DNA híbrido). El contenido total de este DNA semipesado se mantuvo durante varias generaciones, mientras que fue aumentando el contenido en DNA ligero. Para probar si realmente uno de los filamentos del DNA semipesado estaba formado por ^{15}N y el otro por ^{14}N se "fundió" (calentamiento a 100°C) y se enfrió rápidamente. En el gradiente de cloruro de cesio aparecieron entonces dos bandas, típicas de DNA monocatenario ^{14}N y ^{15}N respectivamente.

Los resultados de estos experimentos no están de acuerdo con el mecanismo conservativo ni con el dispersivo; son acordes con la suposición del **mecanismo semiconservativo de replicación del DNA**. En la replicación se separan los filamentos; se desespiralizan. En cada uno de los filamentos tiene lugar la nueva síntesis del filamento complementario. Aquí participan *DNA-polimerasas*. La función de estos enzimas es sencilla; unen entre sí a los nucleótidos que alcanzan su posición correcta por apareamiento de bases, y sintetizan así un nuevo filamento polinucleotídico. Las bases bioquímicas están indicadas en la figura 2.14 y al pie. Los detalles deben buscarse en textos de Biología Molecular.

La síntesis de una cadena polinucleotídica puede explicarse fácilmente: la *DNA-polimerasa* puede ir añadiendo continuamente nucleótidos en dirección 5'→ 3'. No obstante, como la doble hélice de DNA es antiparalela, la síntesis en el filamento contrario tiene que ser en sentido inverso. Esta consideración y los resultados experimentales han conducido a la suposición reflejada en la figura 2.15. Seguramente se forman primero únicamente fragmentos cortos (de 1000 nucleótidos de longitud), llamados fragmentos de Okazaki. Su síntesis se inicia con la formación de una cadena corta de RNA que actúa como cebador (primer). Al RNA le sigue entonces una cadena de DNA, de 1000 a 2000 nucleótidos, sintetizada por la *DNA-polimerasa III*. Por último, se elimina el RNA cebador, se llena el hueco por la función de la *DNA-polimerasa I*, y se cierra mediante una *ligasa*. Según este mecanismo de síntesis discontinua del polinucleótido puede explicarse la replicación del DNA en el segundo filamento.

La figura 2.16 indica cómo puede interpretarse la replicación del cromosoma bacteriano y la división de la célula bacteriana. El mecanismo unidireccional de la replicación del DNA sirve de base a esta representación.

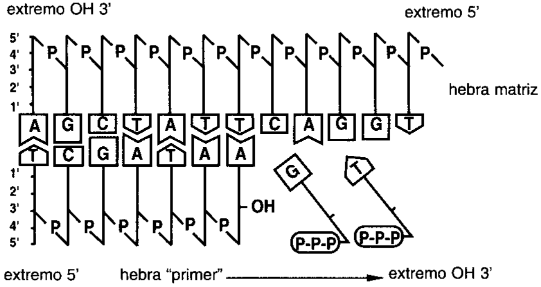


Fig. 2.14 Bases bioquímicas de la función de las *DNA-polimerasas*. La doble hélice de DNA está compuesta por dos cadenas polinucleotídicas de polaridad opuesta (son "antiparalelas"). Cuando un grupo OH 3' se encuentra "libre", no unido a un nucleótido vecino, en el extremo izquierdo de una de las cadenas, este grupo en la otra cadena se localizará en el extremo derecho. La replicación del DNA está catalizada por *DNA-polimerasas*. Este tipo de enzimas necesita para su función una matriz en forma de una cadena de DNA, un "primer" o iniciador (un pequeño fragmento de ácido nucleico) y una mezcla de desoxirribonucleótidos-5'-trifosfatos. Las *DNA-polimerasas* únicamente pueden unir nucleótidos en el extremo OH 3' libre de la cadena nucleotídica. La síntesis únicamente discurre en el sentido (5'→ 3').

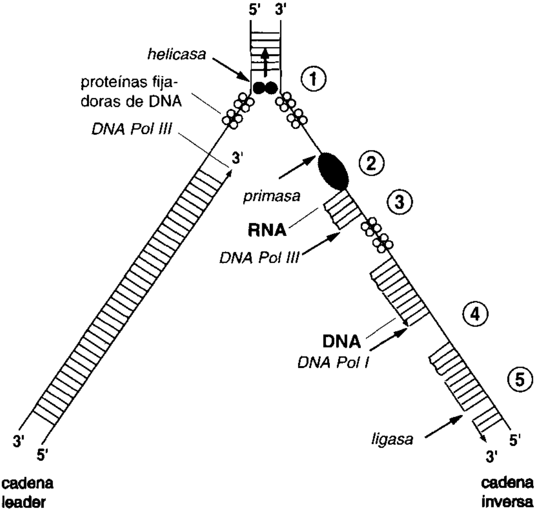


Fig. 2.15 Replicación del DNA de doble cadena. En primer lugar el DNA bicatenario se desespiraliza mediante una *helicasa*, formándose una horquilla de replicación. **1** Las cadenas monocatenarias de DNA se estabilizan por proteínas que se unen al DNA (SSB, single strand binding). Una cadena (la "leader") se replica mediante la *DNA-polimerasa III* (*DNA pol III*) de 3' a 5' (**replicación continua**). **2** La otra hebra ha de replicarse en sentido contrario y, por tanto, de forma **discontinua**. Se inicia con la síntesis de un fragmento corto de RNA, que actúa como molécula starter (RNA-primer) o iniciadora. Aquí está implicada una *primasa*. **3** La *DNA pol III* sintetiza una cadena de DNA a continuación del RNA. **4** A continuación se elimina el RNA por una *exonucleasa* y el hueco se rellena por la *DNA-polimerasa I* **5** y se cierra por la *DNA-ligasa* (de WEHNER, R., W. GEHRING. Zoologie, 22 ed., Thieme, Stuttgart, 1990).

Se ha establecido que la nueva síntesis de las dos cadenas no se realiza sólo en una dirección, sino que a partir de un punto de iniciación se encamina en ambas direcciones en cada uno de los filamentos. Un mecanismo bidireccional de este tipo supone la existencia de dos centros de replicación en una molécula de DNA. La síntesis de las dos nuevas cadenas tiene lugar por tanto en las dos horquillas que aparecen en la desespiralización de la doble cadena. La duplicación del cromosoma de *E. coli* requiere aproximadamente 40 min. Las células de *E. coli*, en condiciones favorables, se multiplican, no obstante, con un tiempo de duplicación de 20 min. Este hecho se explica por el descubrimiento de que en los dos cromosomas hijos se inicia ya un nuevo ciclo de división antes de que se cumpla el primero.

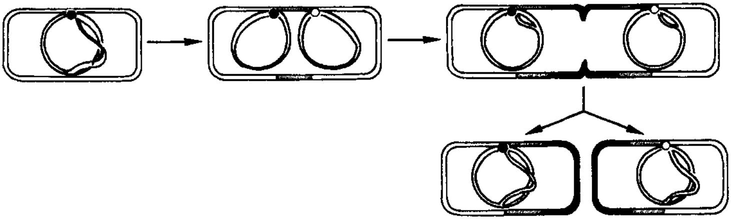


Fig. 2.16 Replicación del cromosoma circular bacteriano y división de la célula bacteriana. Esta representación se basa en el mecanismo unidireccional de la replicación del DNA, esto es, en la presencia de tan sólo un centro de replicación.

Del mecanismo de replicación se dispone de conocimientos mucho más detallados a los que aquí se pueden ofrecer. También existen diferencias considerables entre los mecanismos de replicación de fagos, plásmidos y bacterias. Para profundizar hay que recurrir a la bibliografía de la Biología Molecular.

Tamaño genómico y número de cromosomas. El tamaño genómico de las bacterias se diferencia de una especie a otra, en un rango que va de 0,6 hasta $13 \cdot 10^6$ pares de bases (pb). La mayoría de los genomas tiene el mismo tamaño que el de *Escherichia coli*, esto es, $4{,}6 \cdot 10^6$ kb. El número de genomas por célula difiere igualmente de una especie a otra y depende de las condiciones de cultivo. Células de *Escherichia coli* que crezcan en cultivo estático tienen de 2 a 4 genomas por célula, mientras que *Azotobacter chroococcum* tiene de 20 a 40 y *Desulfovibrio gigas* de 10 a 15. (A efectos comparativos, citemos algunos tamaños genómicos de eucariotas: *Neurospora crassa* $19 \cdot 10^6$ pb, *Aspergillus niger* $40 \cdot 10^6$ pb, el hombre $2{,}9 \cdot 10^9$ pb y *Zea mays* $7 \cdot 10^9$ pb.)

Hibridación DNA-DNA: homología de secuencias en los DNA de especies distintas. Tal como se ha indicado anteriormente, al calentar DNA aislado se separan las dos cadenas de nucleótidos por rotura del enlace de los puentes de hidrógeno. Esta desnaturalización del DNA con formación de cadenas aisladas puede invertirse mediante un enfriamiento lento. En este proceso tiene lugar el apareamiento y reasociación de los fragmentos complementarios. Si se juntan fragmentos cortos de DNA desnaturalizado (fundido) de dos especies bacterianas distintas, aunque "emparentadas", por encima del punto de fusión y se van enfriando, tendrá lugar entonces una reasociación; se denomina **molécula heterodúplex** a las cadenas dobles de DNA compuestas por cadenas sencillas de dos organismos distintos. Naturalmente, para poder seguir la formación de las moléculas heterodúplex experimentalmente, hay que marcar el DNA de una de las bacterias, bien con un isótopo pesado o con uno radioactivo.

Si se hace crecer una bacteria, por ejemplo, en agua pesada (D_2O) se formará DNA pesado y se podrá seguir la formación del heterodúplex por centrifugación en gradientes de ClCs, del mismo modo que en el experimento de MESELSON y STAHL. También se puede cultivar en un medio con ^{14}C o ^{32}P y marcar así su DNA. Si se ponen en contacto fragmentos largos de DNA desnaturalizado (de la bacteria A no marcada con ^{14}C) con fragmentos cortos del DNA desnaturalizado (de la bacteria B marcada con ^{14}C), se enfría lentamente y se filtra a través de un filtro que retenga los filamentos largos, pero que deje pasar a los cortos, las moléculas heterodúplex quedarán fijadas al filtro. La radioactividad que se retiene durante la filtración es tanto mayor cuantos más fragmentos radioactivos (B) se hayan unido a los fragmentos A. Por tanto, la radioactividad depende de si las secuencias de bases del DNA de la bacteria A son totalmente iguales, bastante iguales o totalmente diferentes a las de la bacteria B. Por ello, la reasociación DNA-DNA representa un método para determinar el grado de homología en las secuencias de DNA de distintos orígenes. Se realiza un experimento control con moléculas de DNA de la misma bacteria (una muestra marcada y otra no) al que se le da el grado arbitrario de 100. El grado de reasociación de moléculas de DNA de distintas cepas se expresa en porcentajes de este valor. Los métodos usuales para determinar las homologías de DNA entre cepas distintas de bacterias se han modificado muchas veces, pero se basan en el mismo principio de la formación de heterodúplex: uno de los dos tiene siempre que estar marcado.

La homología en las secuencias del DNA, esto es, la concordancia en la secuencia de bases en las moléculas de DNA de dos cepas bacterianas distintas, es tanto mayor cuanto más próximas están las dos cepas. Este procedimiento es útil para comparar cepas y especies próximas; entre géneros no relacionados el grado de homología es demasiado bajo como para poder demostrar la formación de heterodúplex. El DNA monocatenario también puede reasociarse con RNA. Con los métodos descritos se puede, pues, medir también homologías de bases entre el DNA y el RNA.

Plásmidos. Muchas bacterias tienen además del DNA cromosómico un DNA extracromosómico, que se presenta igualmente como una doble cadena circular y cerrada. Estos elementos constituidos por DNA, de replicación autónoma, se denominan plásmidos. Algunas bacterias disponen de plásmidos lineales (véase pág. 527 y siguientes).

2.2.2 Citoplasma, proteínas y ribosomas

El **citoplasma** se separa hacia la pared celular mediante una membrana citoplasmática. En él se encuentran las inclusiones celulares (vesículas, grana), incluido el núcleo. La microscopía electrónica y las investigaciones bioquímicas han puesto de manifiesto que el citoplasma no constituye una solución homogénea de proteínas, sino que está atravesado por numerosas membranas, que contiene diversos tipos de cuerpos membranosos y que el resto está ocupado por una sustancia plasmática básica y por ribosomas. Centrifugando a 100 000 *g* durante varias horas pueden separarse el citoplasma diluido en un medio acuoso, la fracción "soluble", que contiene predominantemente enzimas solubles y ácidos ribonucleicos (RNA) solubles, y una fracción particulada, que junto a las membranas contiene sobre todo ribosomas. Los enzimas solubles catalizan un gran número de reacciones de degradación y de síntesis. Los ácidos ribonucleicos solubles (RNA mensajero –m– y el RNA de transferencia –t–) y los ribosomas están implicados en la biosíntesis proteica.

Proteínas. Están compuestas por aminoácidos, unidos entre sí según una secuencia definida mediante enlaces peptídicos para formar una cadena polipeptídica. Estas cadenas polipeptídicas presentan una disposición espacial (conformación) perfectamente definida. Esta estructura se estabiliza mediante enlaces adicionales: por enlaces covalentes (de valencia principal) y enlaces no covalentes (valencias secundarias) (Fig. 2.17).

Según la participación de los distintos tipos de enlace se diferencian distintos grados de estructura: la **estructura primaria** de una proteína queda definida por el número y la secuencia de aminoácidos unidos covalentemente. La cadena polipeptídica adquiere a través de puentes de hidrógeno entre los átomos de oxígeno del carbonilo y los de nitrógeno de los gru-

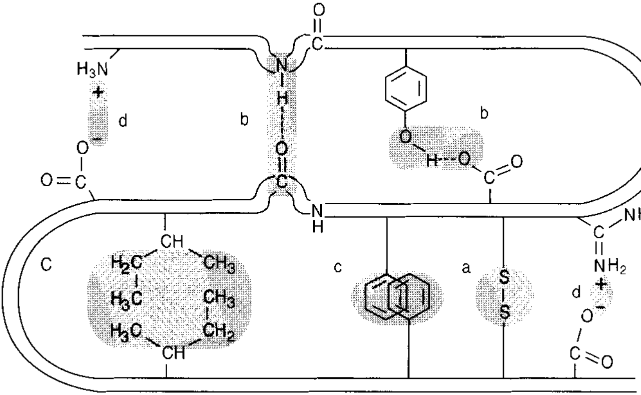


Fig. 2.17 Posibles enlaces intramoleculares entre distintos fragmentos de cadenas polipeptídicas. (a) enlace disulfuro covalente; (b) puente de hidrógeno; (c) enlace apolar (hidrófobo); (d) enlace iónico (según F. Lynen, Naturw. Rdsch. 23, 266 [1970]).

pos amida una **estructura secundaria**, ya sea una ordenación helicoidal (α-hélice) o en estructura de hoja plegada. Debido al efecto recíproco entre los diversos grupos laterales de la cadena polipeptídica se estabiliza una estructura espacial superior, que se denomina **estructura terciaria**. En su formación participan otros puentes de hidrógeno, enlaces iónicos y enlaces apolares (hidrófobos). Los enlaces cruzados en la misma cadena polipeptídica pueden ser también covalentes, por ejemplo, los enlaces disulfuro que surgen tras la oxidación de los grupos SH. Por último, pueden formarse agregados por interacción entre diversas cadenas polipeptídicas. La estructura de una proteína a partir de un número determinado de cadenas polipeptídicas (subunidades) se denomina **estructura cuaternaria**. En condiciones fisiológicas las proteínas se encuentran en una fase acuosa. Como consecuencia, también se establecen interacciones entre las proteínas y los dipolos del agua. Los grupos polares están hidratados. Los factores que modifican las cargas de las proteínas (la concentración en iones H^+, Ca^{2+}, Mg^{2+}, K^+, etc.) repercuten por tanto inevitablemente en el grado de hidratación y con ello en el estado de las proteínas.

Ribosomas. Los ribosomas son los lugares de la síntesis proteica. En las micrografías electrónicas se reconocen como partículas en el citoplasma. Las dimensiones de los ribosomas de las bacterias son de 16 × 18 nm. Del 80 al 85% del RNA bacteriano está en los ribosomas. Ya que los ribosomas intactos tienen una velocidad de sedimentación en la ultracentrífuga de 70 unidades SVEDBERG, se habla de ribosomas 70S. Los ribosomas citoplasmáticos de los eucariotas –con pocas excepciones– son algo mayores, y se denominan ribosomas 80S.

Los ribosomas se componen de dos subunidades; en las bacterias se trata de partículas 30S y 50S (Fig. 2.18), que unidas forman el ribosoma 70S. Desde el punto de vista de las dimensiones y otras muchas propiedades, los ribosomas de las bacterias se parecen a los de las mitocondrias y los cloroplastos.

Una célula bacteriana tiene aproximadamente de 5000 a 50 000 ribosomas; el número es tanto mayor cuanto más deprisa crece la célula. Durante la síntesis proteica activa, en la célula pueden verse en micrografías electrónicas de cortes finos cadenas de ribosomas ordenados regularmente. Se trata de ribosomas alineados como perlas de un collar a lo largo de filamentos de RNAm. A éstos se les denomina polirribosomas o polisomas.

Las diferencias entre los ribosomas de las bacterias (70S) y de los eucariotas (80S) son de importancia decisiva para combatir enfermedades infecciosas; algunos antibióticos interfieren o impiden la síntesis proteica que transcurre en los ribosomas 70S, y no afectan a la función de los ribosomas 80S (pág. 225).

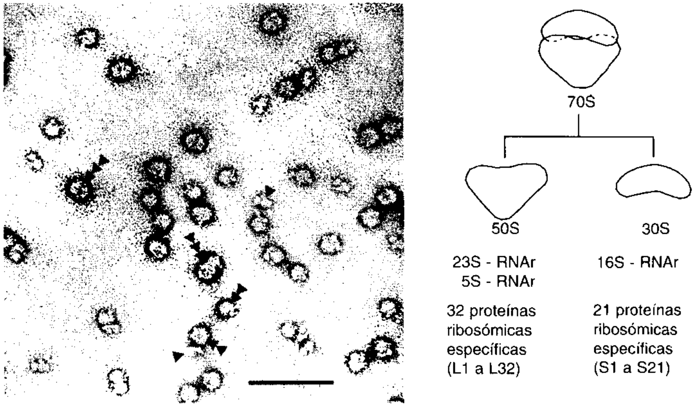
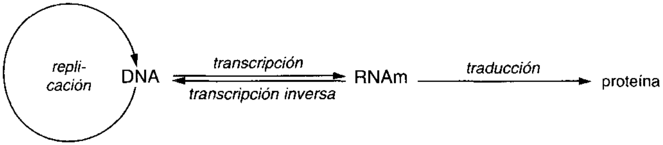

70S
50S
30S
23S - RNAr
5S - RNAr
16S - RNAr
32 proteínas ribosómicas específicas (L1 a L32)
21 proteínas ribosómicas específicas (S1 a S21)

Fig. 2.18 Ribosomas de las bacterias. La electromicrografía de la izquierda muestra los ribosomas de *E. coli*. Los ribosomas intactos 70S se señalan con tres puntas de flecha, las partículas 50S con dos y las 30S con una. El segmento tiene una longitud de 100 nm (foto: E. Spiess). La parte derecha de la figura muestra la composición de los ribosomas en subunidades y en moléculas ribosómicas de RNA y proteínas.

Constitución del RNA. El ácido ribonucleico se diferencia del DNA tanto por sus constituyentes como por su estructura secundaria. La espina dorsal del filamento polinucleotídico está formada por ribosa y ácido fosfórico. Las bases presentes son también adenina, guanina y citosina, pero en lugar de la timina se encuentra el uracilo. Además el RNA tiene otras varias bases raras (pseudouracilo). En la célula el RNA es de una sola cadena; el apareamiento de bases es sólo parcial.

Transcripción del DNA. En la síntesis proteica se transfiere indirectamente la información contenida en el DNA, a través del RNA. Esta transferencia de información del DNA al RNA se denomina **transcripción**. La molécula resultante de RNA es el **RNA mensajero**, abreviadamente **RNAm**. Es de una sola cadena. La síntesis del RNAm se realiza en una sola de las dos cadenas del DNA, en la cadena codificante, iniciándose en su extremo 3'. El RNAm es directamente complementario de la cadena de DNA codificante. Por tanto, durante la transcripción simplemente se copia la secuencia de bases del DNA. El enzima sintetizador del RNAm es una proteína relativamente grande. Está compuesta por varias subunidades (SU), en *E. coli* de dos SU α, otra ß y otra ß' (abreviatura α_2ßß'). Esta *RNA-polimerasa* requiere para el inicio de la síntesis de otra SU, el factor sigma (σ). Éste participa en el reconocimiento del punto de inicio del fragmento de DNA que ha de transcribirse y que se conoce como **promotor**. Posteriormente el factor σ ya no es indispensable. En la transcripción se abre la doble hélice del DNA. La figura 2.19 representa este proceso. La síntesis de RNA se detiene cuando se alcanza un **terminador**, constituido por una determinada secuencia de bases del DNA. Frente a la transcripción se sitúa la **traducción**, el verdadero proceso de transformación de la secuencia de nucleótidos en la de aminoácidos.



El código genético. Cada **gen** está representado por un fragmento concreto de la molécula de DNA. La información específica del gen está determinada por la secuencia de bases en la cadena de DNA, el orden de estas bases. La escritura en la que está cifrada la información de los genes en el DNA dispone por tanto de cuatro signos: las bases adenina (A), guanina (G), timina (T) y citosina (C). En la escritura del RNAm aparece el uracilo (U) en lugar de la timina.

La especificidad de la proteína enzimática, cuya síntesis ha sido dirigida por los genes, se basa en la secuencia de los aminoácidos en las cadenas polipeptídicas. La secuencia de aminoácidos determina también la estructura espacial, la llamada conformación, de la proteína (estructura secundaria, terciaria y cuaternaria).

Entre la escritura de los ácidos nucleicos y la de los aminoácidos ha de existir un **código** o **clave de traducción**. La secuencia de tres nucleótidos, **triplete** o **codon**, determina un aminoácido. La secuencia de los tripletes en el ácido nucleico determina la secuencia de los aminoácidos en la cadena polipeptídica; ésta es por tanto la imagen colinear del ácido nucleico. La ordenación de los tripletes permite 64 posibilidades distintas de combinación (Tab. 2.1). Si cada uno de los 20 aminoácidos estuviera codificado por un único triplete, quedarían 44 posibilidades de combinación sin utilizar. Muchos aminoácidos están codificados por dos o más tripletes distintos. Los tripletes se leen a partir del inicio del RNAm contando 1, 2, 3; 1, 2, 3;... Algunos tripletes tienen una significación especial: AUG codifica para el aminoácido metionina y actúa como **codon de iniciación**. Los tripletes UAA, UAG y UGA son codones sin sentido o **codones de stop** (no codifican para ningún aminoácido); son la señal de final de la traducción de un fragmento del RNAm.

Síntesis proteica: la traducción del RNAm. Los aminoácidos se reúnen en cadenas polipeptídicas siguiendo la secuencia determinada por los tripletes del RNAm. En este proceso participan: el RNAm, el RNA de transferencia (RNAt), los ribosomas y algunos enzimas, el ATP y otros factores.

Tab. 2.1 **El código genético.** Los tripletes o codones determinan los 20 aminoácidos indicados. Los codones UAA, UAG y UGA determinan la finalización de la síntesis proteica y se conocen como codones de terminación. Se indican las abreviaturas de los aminoácidos, con una y con tres letras. Existen muy pocas excepciones a las reglas del codon, como p. ej. en los ciliados o en las mitocondrias. En *E. coli* el codon de terminación UGA codifica para el aminoácido selenocisteína, poco usual.

UUU	**Phe**	UCU	**Ser**	UAU	**Tyr**	UGU	**Cys**
UUC		UCC		UAC		UGC	
UUA	**Leu**	UCA		UAA	**Stop**	UGA	**Stop**
UUG		UCG		UAG	**Stop**	UGG	**Trp**
CUU	**Leu**	CCU	**Pro**	CAU	**His**	CGU	**Arg**
CUC		CCC		CAC		CGC	
CUA		CCA		CAA	**Gln**	CGA	
CUG		CCG		CAG		CGG	
AUU	**Ile**	ACU	**Thr**	AAU	**Asn**	AGU	**Ser**
AUC		ACC		AAC		AGC	
AUA		ACA		AAA	**Lys**	AGA	**Arg**
AUG	**Met**	ACG		AAG		AGG	
GUU	**Val**	GCU	**Ala**	GAU	**Asp**	GGU	**Gly**
GUC		GCC		GAC		GGC	
GUA		GCA		GAA	**Glu**	GGA	
GUG		GCG		GAG		GGG	

Ala	A	alanina
Arg	R	arginina
Asp	D	ác. aspártico
Asn	N	asparagina
Cys	C	cisteína
Glu	E	ác. glutámico
Gln	Q	glutamina
Gly	G	glicina
His	H	histidina
Ile	I	isoleucina
Leu	L	leucina
Lys	K	lisina
Met	M	metionina
Phe	F	fenilalanina
Pro	P	prolina
Ser	S	serina
Thr	T	treonina
Trp	W	triptófano
Tyr	Y	tirosina
Val	V	valina

En primer lugar los aminoácidos se activan a aminoacil-AMP con participación del ATP:

$$\text{aminoácido} + \text{ATP} \longrightarrow \text{aminoacil-AMP} + \text{PP}_i$$

Mediante el AMP los restos del aminoacil se transfieren al nucleótido terminal del RNAt. La activación y unión del aminoácido con el RNAt correspondiente tiene lugar siempre a través de un enzima específico, la *aminoacil-RNAt-sintetasa*; ésta reconoce por una parte al aminoácido y por otra al RNAt correspondiente. Existen 20 *aminoacil-RNAt-sintetasas* distintas, una para cada aminoácido. Tal como se ha indicado existen varios codones para algunos aminoácidos (se dice: “el código genético es degenerado”); para estos aminoácidos existen por tanto también varios RNAt. Los distintos RNAt de un mismo aminoácido se denominan también RNAt isoaceptores. La *sintetasa* correspondiente puede cargarse por tanto con varios RNAt isoaceptores. El RNAt dispone de una zona que es complementaria del triplete del RNAm (el anticodon). La unión de los aminoácidos tiene lugar en los **ribosomas** (Fig. 2.19A y B). Empezando por el extremo OH 5’ el ribosoma discurre a lo largo del RNAm; el aminoácido es llevado por el RNAt al lugar que le corresponde y se une con su grupo amino mediante un enlace peptídico al grupo carboxilo del aminoácido antecesor. Al mismo tiempo que el RNAm es recogido por el

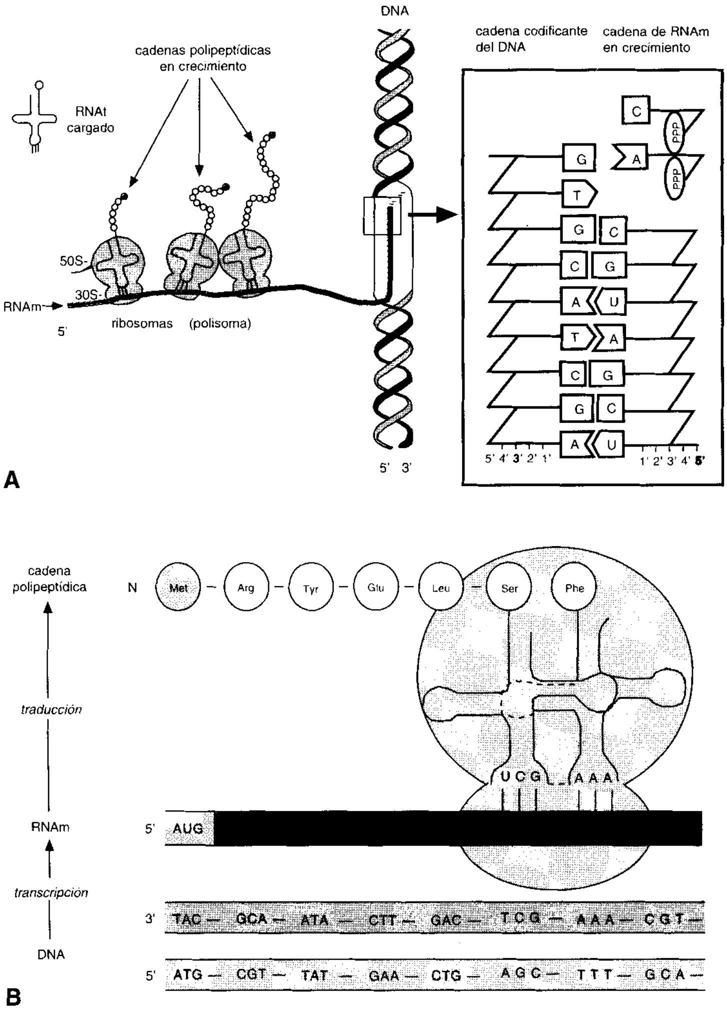

DNA
cadenas polipeptídicas en crecimiento
RNAt cargado
50S
30S
RNAm
5'
ribosomas (polisoma)
5' 3'
cadena codificante del DNA
cadena de RNAm en crecimiento
C
PPP
G
A
PPP
T
G C
C G
A U
T A
C G
G C
A U
5' 4' 3' 2' 1'
1' 2' 3' 4' 5'
A
cadena polipeptídica
N
Met
Arg
Tyr
Glu
Leu
Ser
Phe
traducción
UCG
AAA
RNAm
5'
AUG
transcripción
DNA
3' TAC — GCA — ATA — CTT — GAC — TCG — AAA — CGT —
5' ATG — CGT — TAT — GAA — CTG — AGC — TTT — GCA —
B

Fig. 2.19 Esquema de la biosíntesis proteica. La transferencia de la información genética se realiza en dos pasos. En primer lugar se forma el RNAm en la cadena codificante de DNA. Durante el traslado de los ribosomas (de izquierda a derecha) a lo largo del RNAm se van acoplando los aminoácidos mediante el RNAt en la situación determinada por el triplete y se unen por enlaces peptídicos; **A** visión de conjunto, **B** representación detallada.

ribosoma va creciendo la cadena polipeptídica. Aparentemente, debido a la secuencia de los aminoácidos y al tipo de sus cadenas laterales (grupos hidrófobos e hidrófilos) determina una estructura con giros y enrollamientos de la cadena polipeptídica.

Aparentemente se fijan siempre varios ribosomas simultáneamente al RNAm y la misma matriz es la que se utiliza para la síntesis de varias cadenas polipeptídicas. Este complejo de ribosomas y RNAm se denomina también **polisoma**.

Así, la secuencia de nucleótidos del DNA representa un código que determina la estructura específica de las proteínas a través del RNAm. La transferencia de la información del DNA a las proteínas mediante el RNA se ha calificado como "dogma central" de la Biología Molecular. De este modo se realiza la transferencia de la información genética en todos los organismos. El proceso universal de transferencia de información en la replicación del DNA, en la transcripción y en la traducción se indica con flechas rojas en el esquema de la pág. 40. Este esquema es válido para eucariotas, procariotas y virus DNA. En algunos virus RNA éste se replica directamente.

Entre los virus RNA existen algunos en los que el RNA se replica directamente. En algunos virus RNA oncogénicos (inductores de tumores) tiene lugar no obstante una síntesis de DNA dirigida por el RNA; el RNA actúa como matriz para la síntesis del DNA. La información contenida en el RNA vírico se transfiere al DNA mediante un proceso inverso al de la transcripción (por una *transcriptasa inversa*) (pág. 40). El enzima puede aislarse de células con tumores de virus ARN. Tiene utilidad en la manipulación genética (apartado 15.5, Técnica molecular de clonación). Cuando, por ejemplo, se aísla RNAm como portador de la información genética en lugar del fragmento correspondiente de DNA, tiene que transformarse primero en DNA, y éste se incorpora al plásmido. Con ayuda de la *transcriptasa inversa* puede fabricarse *in vitro* el DNA deseado.

Transcripción y traducción son puntos de ataque para toda una serie de antibióticos (véase también el apartado 6.6). Lo interesante en la acción de estos antibióticos es su elevada especificidad y selectividad. El ácido nalidíxico (un compuesto de síntesis) y la novobiocina inhiben el desenrollamiento del DNA durante la replicación y la transcripción. La rifampicina inhibe a la *RNA-polimerasa* de los procariotas.

La síntesis proteica, especialmente la traducción, se inhibe en los procariotas mediante la estreptomicina, la neomicina, la eritromicina, las tetraciclinas y el cloranfenicol, mientras que la cicloheximida y la toxina diftérica lo hacen sobre los eucariotas. La rápida investigación de los sucesos moleculares en el curso de la síntesis proteica se debe en gran parte a la investigación de los mecanismos de actuación de los antibióticos.

2.2.3 Membranas

Membrana citoplasmática. La membrana citoplasmática bacteriana se ve en cortes ultrafinos de bacterias fijadas con tetróxido de osmio como formada por varias capas; dos capas osmiófilas, y por tanto oscuras, de 2-3 nm de grosor incluyen a otra más clara de 4-5 nm. Las membranas de las bacterias, animales y plantas tienen una estructura muy similar; pareció por eso adecuado hablar de una membrana elemental o membrana unitaria ("unit membrane").

La membrana citoplasmática puede aislarse mediante choque osmótico de protoplastos obtenidos con *lisozima*. Es rica en lípidos, sobre todo fosfolípidos (Tab. 2.2). Las membranas suponen del 8-15% del peso seco celular, y contienen del 70 al 90% de los lípidos.

La membrana citoplasmática consta de una doble capa de lípidos. Los extremos hidrófobos de los fosfolípidos y los triglicéridos se orientan hacia dentro y las "cabezas" hidrófilas hacia fuera. La membrana se estabiliza por interacciones hidrófobas entre residuos de ácidos grasos de los lípidos y por interacciones electrostáticas entre sus cabezas hidrófilas. En estas capas dobles se introducen proteínas: las proteínas integrales de la membrana citoplasmática, "nadan" en la doble capa. Otras proteínas están ancladas en la membrana y se las denomina proteínas periféricas de la membrana (Fig. 2.20). Algunas membranas parecen estar recubiertas por una red de moléculas proteicas alargadas en uno o en los dos lados de la membrana.

Hay que imaginarse la membrana citoplasmática como una estructura bastante blanda, plástica, casi fluida: las membranas que están aisladas tienden a fusionarse en pequeñas vesículas cerradas; los fragmentos se funden en sus cantos.

La membrana citoplasmática tiene funciones metabólicas decisivas. Es la barrera osmótica de la célula y controla la entrada de sustancias en la célu-

Tab. 2.2 Componentes de las membranas de *Micrococcus luteus* (*lysodeikticus*) y de bacterias fototrofas.

Componentes	en % del peso seco de las membranas de *M. luteus*	 de bacterias rojas
Lípidos	28-37	40-50
neutros	9	10-20
fosfolípidos	28	30
Proteína	50	50
Hexosas	15-20	5-30

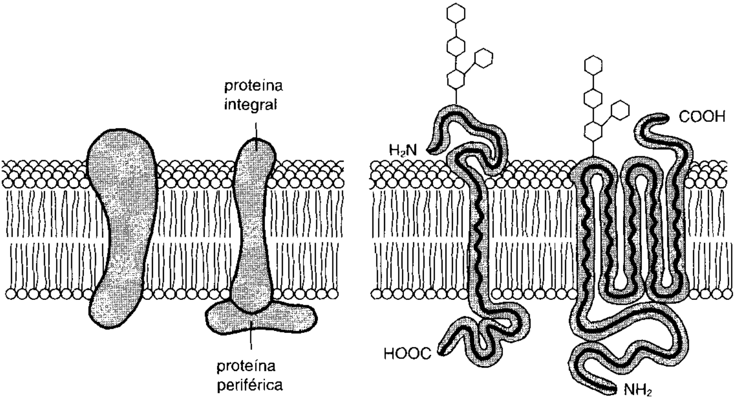


Fig. 2.20 Modelo de la membrana citoplasmática. En la membrana lipídica se incluyen las proteínas integrales. Las proteínas periféricas únicamente están ancladas en la superficie de la membrana. En la parte superior se indican las cadenas laterales de poli u oligosacáridos, que poseen algunas membranas.

la, y también su salida. Es el lugar donde se encuentran los sistemas de transporte activo y los sistemas de las *permeasas* específicas. La doble capa lipídica constituida por fosfolípidos supone diferentes grados de resistencia a ser atravesada por diversas sustancias. Las velocidades de difusión indicadas en la figura 2.21 muestran que las sustancias no polares, hidrofóbicas pueden difundir fácilmente a través de las capas que constituyen la membrana citoplasmática, pero prácticamente no pueden pasar los iones. El transporte de sustratos al interior de la célula (influjo) y de salida al exterior (eflujo) viene determinado por proteínas integrales de membrana, siendo cada una específica de un único sustrato o de un grupo relacionado de sustratos.

Los enzimas del transporte de electrones y de la fosforilación oxidativa, que en los eucariotas están en las mitocondrias, en las bacterias se localizan en, o junto a, las membranas. Los citocromos, proteínas sulfoférricas y otros componentes del transporte de electrones se encuentran únicamente en la membrana. Respecto a la localización de los componentes individuales, la membrana citoplasmática es asimétrica. Por ejemplo, algunos citocromos y otras proteínas implicadas en el transporte de electrones se localizan en la cara externa de la membrana, sin embargo la *ATP-sintasa* se encuentra en la cara interna (apartado 7.4). Otros procesos biosintéticos, como la síntesis de los componentes de la pared celular y de la cápsula, y la excreción de exoenzimas, también son probablemente funciones de la membrana. Por último, es muy probable también que el cen-

moléculas no polares, hidrófobas	N_2, O_2, benceno, CH_4, N_2O, H_2
moléculas polares, pequeñas, no cargadas	H_2O, urea, glicerina, CO_2
moléculas polares, grandes, no cargadas	glucosa, sacarosa
iones	Na^+, K^+, Mg^{2+}, Ca^{2+} HCO_3^-, Cl^-, HPO_4^{2-}
moléculas polares, grandes, cargadas	glucosa-6-fosfato^{2-} ATP^{4-}, aminoácidos

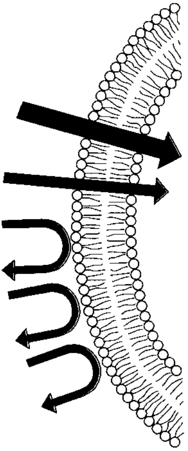


Fig. 2.21 Permeabilidad de una doble capa lipídica frente a moléculas diversas. Los coeficientes de difusión (cm/s) de los iones son de un orden de magnitud 8 o 10 veces inferior que el del oxígeno o del benceno.

tro de la replicación del DNA esté localizado en la membrana, y los flagelos tienen aquí su punto de anclaje.

Membranas intracitoplasmáticas y lamelas. En algunas bacterias la membrana engloba al citoplasma sin pliegues ni invaginaciones. En otras bacterias la membrana está invaginada, atraviesa el citoplasma o forma cuerpos membranosos. En la mayoría de las bacterias se han descrito mesosomas. No obstante, es muy probable que se trate de artefactos en las preparaciones.

En *Nitrobacter*, *Nitrosomonas* y *Nitrosococcus* se ven paquetes de lamelas, compuestos por vesículas planas paralelas, algunas de las cuales están conectadas con la membrana citoplasmática (Fig. 2.22 y 2.24).

Las bacterias rojas fototrofas son especialmente ricas en membranas intracitoplasmáticas. En cortes ultrafinos se ven los sistemas de membranas fotosintéticos intracitoplasmáticos como tubos, vesículas o pilas. En *Rhodospirillum rubrum* o en *Chromatium* la luz celular está rellena de vesículas densamente apiladas dispuestas esféricamente (véase Fig. 2.23). Estas vesículas se originan seguramente por invaginación y crecimiento tubular de la membrana citoplasmática. Por constricción de estos túbulos a intervalos regulares quedan estranguladas las vesículas, aunque sin quedar totalmente separadas. Tan sólo al romper y homogeneizar la célula que-

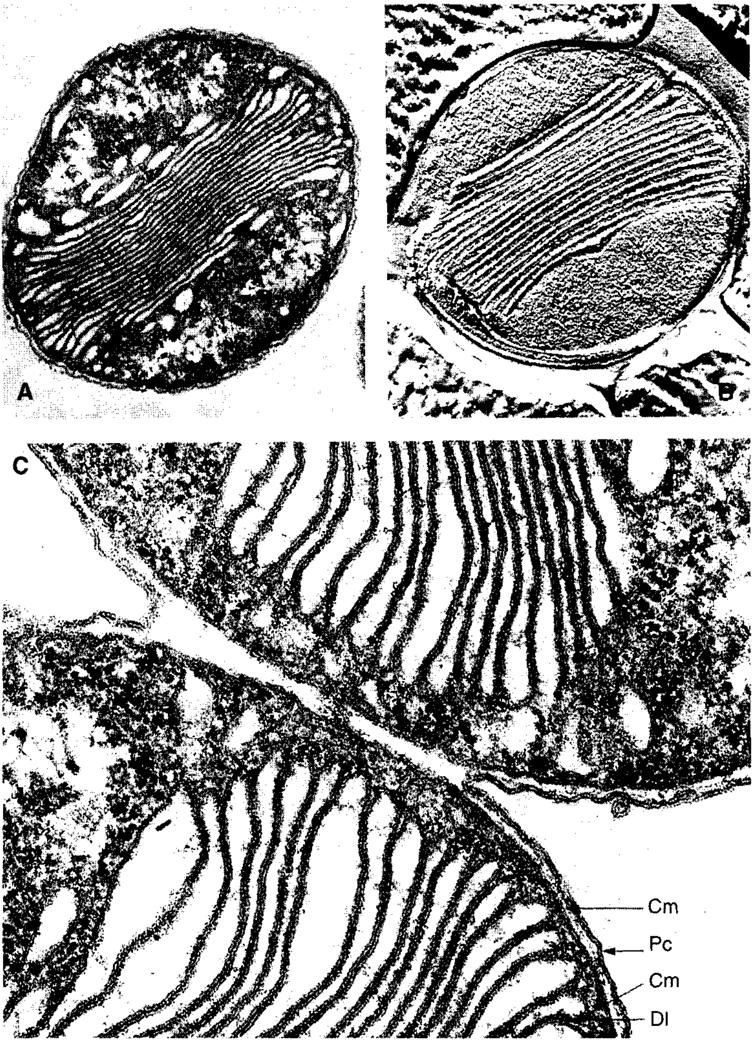


Fig. 2.22 Micrografía electrónica de una bacteria marina oxidadora del nitrito, *Nitrosococcus oceanus*. **A** y **C** cortes ultrafinos (fijación con OsO_4) y **B** preparación conseguida por criofractura (A y B: 22 000 aumentos; C: 81 000 aumentos) (de Remsen, C.C., F.W. Valois, S.W. Watson: J. Bacteriol. 94 [1967] 422) Cm = membrana citoplasmática; Dl = lamelas dobles; Pc = pared celular.

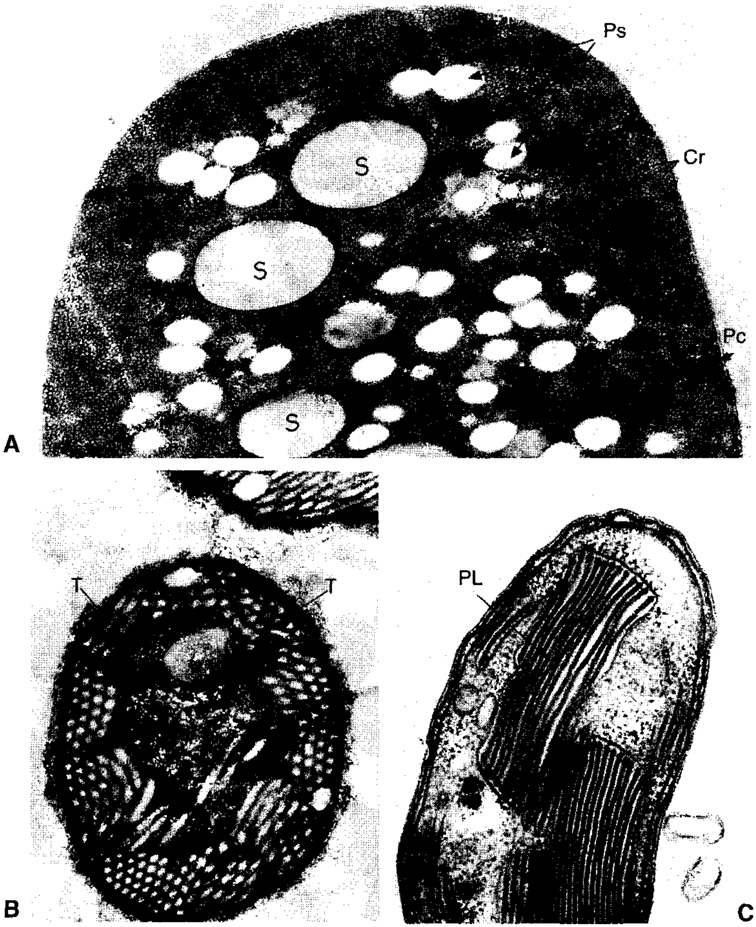


Fig. 2.23 Los pigmentos fotosintéticos de las bacterias rojas fotosintéticas van ligados a membranas intracitoplasmáticas. Las diferentes especies bacterianas incrementan de distintos modos las superficies membranosas. En *Chromatium okenii* estas estructuras tienen aspecto vesicular y se denominan vesículas o cromatóforos **A**. *Thiocapsa pfennigii* dispone de membranas fotosintéticas tubulares **B**. En *Ectothiorhodospira mobilis* las membranas están replegadas varias veces y se presentan en forma de paquetes de lamelas **C**. Cr = cromatóforos; PL = paquetes de lamelas; Ps = gránulo de polisacárido; S = gota de azufre; T = membranas fotosintéticas tubulares; Pc = pared celular. (A: Foto G. Kran; B: Foto K. Eimhjellen; C: de Remsen, C.C., S.W. Watson, J.B. Waterbury, H.G. Trüper: J. Bacteriol. 95 [1968] 2374.)

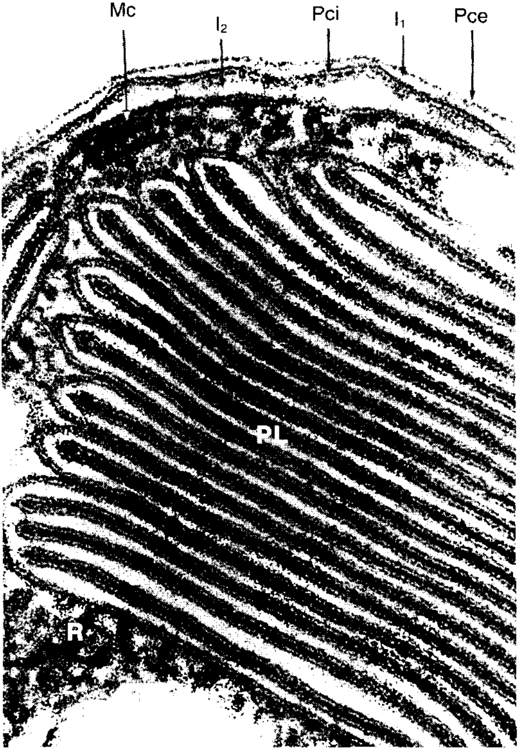


Fig. 2.24 ***Ectothiorhodospira mobilis*** **con paquetes de lamelas fotosintéticas.** Micrografía electrónica (150 000 aumentos) de un corte ultrafino. Mc = membrana citoplasmática; PL = paquetes de lamelas; R = ribosomas; Pce = capa externa de la pared celular; Pci = capa interna de la pared celular; I_1 e I_2 = capas intermedias externa e interna transparentes a los electrones (de REMSEN, C.C., S.W. WATSON, J.B. WATERBURY, H.G. TRÜPER: J. Bacteriol. 95 [1968] 2374).

dan libres las vesículas como esférulas aisladas, que también se denominan "cromatóforos". En otras bacterias rojas las vesículas están muy aplanadas y se apilan ordenadamente (véase Fig. 2.23 y Fig 2.24), por lo que en analogía con los cloroplastos de las plantas verdes se denominan también pilas de tilacoides.

Las membranas fotosintéticas tienen una constitución y composición semejantes a la de la membrana citoplasmática (Tab. 2.2), y son portadoras de los pigmentos de captación de luz (bacterioclorofilas y carotenoides) así como de los componentes de los sistemas fotosintéticos de transporte de electrones (citocromos, ubiquinona) y de fosforilación.

2.2.4 Pared celular

La pared celular de las bacterias no es rígida como una esfera de acero, sino delgada y elástica como la cubierta de cuero de un balón de fútbol. Igual que la cámara hinchada de un balón, el protoplasto totalmente lleno de la célula confiere una cierta rigidez. La presión interna o turgencia está determinada osmóticamente. La barrera osmóticamente activa es la membrana citoplasmática; es semipermeable y controla la entrada y salida de sustancias disueltas. En contraposición, la pared celular es permeable a las sales y numerosas sustancias de bajo peso molecular.

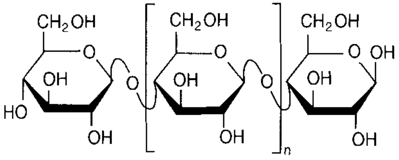
Plasmólisis. Normalmente la concentración de azúcares y sales, que son osmóticamente activas, es superior en el interior de las células que en el exterior; el valor osmótico del contenido celular es equivalente al de una disolución al 10-20% de sacarosa; la célula capta tanta agua como le permite la pared celular. Si se eleva el valor osmótico del medio externo a niveles superiores al del contenido celular, por adición de azúcares o urea, por ejemplo, entonces se le extrae el agua a la célula y el protoplasto se encoje, por lo que la membrana citoplasmática se separa de la pared celular. Este proceso que tiene lugar en un medio hipertónico se denomina plasmólisis. Esta contracción del protoplasto permite demostrar en células bacterianas grandes, que la membrana citoplasmática está rodeada por una pared celular. La pared celular y la membrana citoplasmática pueden teñirse también con el colorante básico hidrosoluble azul Victoria.

Tinción de Gram. Es evidente también que la pared celular es responsable de la tinción de Gram. La propiedad de teñirse o no de violeta oscuro según la tinción introducida por GRAM (1884) es una característica taxonómica importante, con la que se correlacionan también otras propiedades de las bacterias. El procedimiento de la tinción de Gram se inicia con una tinción de las células bacterianas fijadas mediante el colorante básico cristal violeta. A continuación se trata con una disolución de yodo. El yodo forma una laca con el cristal violeta, que es insoluble en agua y sólo medianamente soluble en alcohol o acetona. Las células se tratan después con alcohol, o se "diferencian": las células Gram positivas retienen el complejo colorante-yodo y quedan azules, las células Gram negativas son decoloradas por el alcohol. Estas últimas se hacen visibles mediante una coloración de contraste con otro colorante (fucsina).

Si se tratan con *lisozima* células Gram positivas después de la tinción, se ve que los protoplastos siguen teñidos, pero pierden el colorante si se las trata con alcohol. Las esporas en germinación de *Bacillus subtilis* y las primeras generaciones posteriores a la germinación se comportan como Gram negativas. Hasta más tarde no adquieren el carácter Gram positivo. Los resultados indican que el complejo del colorante se localiza en, o sobre, el protoplasto, y que la pared celular de las bacterias Gram positivas es la que impide la extracción del colorante.

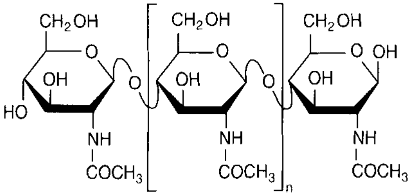
Constitución de la pared celular bacteriana. Para comprender la constitución de la pared celular bacteriana indicaremos su semejanza estructural con los polímeros de la β-D-glucosa, celulosa y quitina.

La celulosa es el componente básico de las paredes celulares de las plantas superiores e inferiores, de las algas y de los oomicetos. La celulosa no está difundida entre las bacterias como material de la pared celular, pero por ejemplo, mantiene las células de *Sarcina ventriculi* juntas formando grandes paquetes. También es excretada al medio por *Acetobacter aceti* subsp. *xylinum*, en forma de fibrillas delgadas, y le confieren al "mycoderma aceti" una consistencia como de cuero.



celulosa

La quitina es el esqueleto externo de los artrópodos y otros grupos animales. Es el constituyente esencial de la pared celular de grandes grupos de hongos (basidiomicetos, ascomicetos y zigomicetos). La unidad de la quitina es la *N*-acetilglucosamina; estos monómeros están unidos entre sí –igual que la glucosa en la celulosa– mediante uniones ß-1,4 glucosídicas.



quitina

El esqueleto de la pared celular bacteriana está constituido igualmente por un polímero ampliamente uniforme, el glucopéptido **mureína**. Esta macromolécula es un heteropolímero formado por cadenas en las que se alternan *N*-acetilglucosamina (GlcNac) y un éter láctico de la *N*-acetilglucosamina, el ácido *N*-acetilmurámico (MurNac) unidos mediante enlaces β-1,4 glucosídicos.

Estas cadenas de heteropolímeros son rectas y no ramificadas, constituyendo la estructura básica de la mureína. Los eslabones de ácido murámico se unen a través del grupo lactilo a aminoácidos mediante enlaces peptídicos. Entre los aminoácidos típicos de la mureína se cuentan L-alanina, ácido D-glutámico, ácido *m*-diaminopimélico (Dpm) o L-lisina y D-alanina. Los diaminoácidos *m*-diaminopimélico (o LL) y la LL-lisina tienen un papel importante en el entramado intramolecular, ya que con los dos grupos amino pueden formar enlaces peptídicos, y unir así dos cadenas de heteropolímeros (Fig. 2.25). En lugar del ácido diaminopimélico o lisina pueden aparecer ornitina y ácido diaminobutírico. A través de estas uniones peptídicas se unen entre sí las cadenas de heteropolímeros para formar una molécula gigante, el **sáculo de mureína**. El modelo clásico, según el cual se ve a las cadenas de heteropolímeros como fibras circulares cerradas, que se orientan en la pared celular de una bacteria bacilar como el cerco de un tonel o perpendicularmente, ya no es aplicable. Los heteropolímeros tienen más bien una longitud de cadena que tan sólo corresponde a un décimo o menos del perímetro de una bacteria. Hay que suponer que cadenas de 50 a 500 disacáridos (GlcNac + MurNac) se unen mediante enlaces peptídicos y que forman una red menos regular de lo que se había supuesto en un principio. El espacio limítrofe con la membrana citoplasmática, el **espacio periplásmico**, tiene aparentemente una consistencia gelatinosa.

Merece especial atención el que la pared celular bacteriana contiene sustancias que no se presentan ni en las plantas ni en los animales: la secuencia alternante de *N*-acetilglucosamina y *N*-acetilmurámico, el ácido *m*-diaminopimélico (Dpm) y las formas D de la alanina (Ala) y del ácido glutámico (Glu), aminoácidos que no se presentan en las proteínas. En estos elementos estructurales brindan las bacterias un "tendón de Aquiles" para la terapia médica; las bacterias se diferencian esencialmente de animales y plantas en los componentes y estructura, así como en las reacciones implicadas en la síntesis de la pared celular. Los agentes terapéuticos que afecten específicamente sólo a la pared celular bacteriana y a su síntesis, deben ser inocuos para el organismo superior hospedador.

La presencia de una capa de glucopéptido en las paredes celulares es una característica general de todas las eubacterias dentro de los procariotas. Tan sólo las arqueobacterias y otros pequeños grupos y especies no forman glucopéptidos del tipo descrito.

El sáculo de mureína constituye **el esqueleto de la pared celular**, y en él se incrustan, o se depositan sobre él, una serie de sustancias. Las bacterias

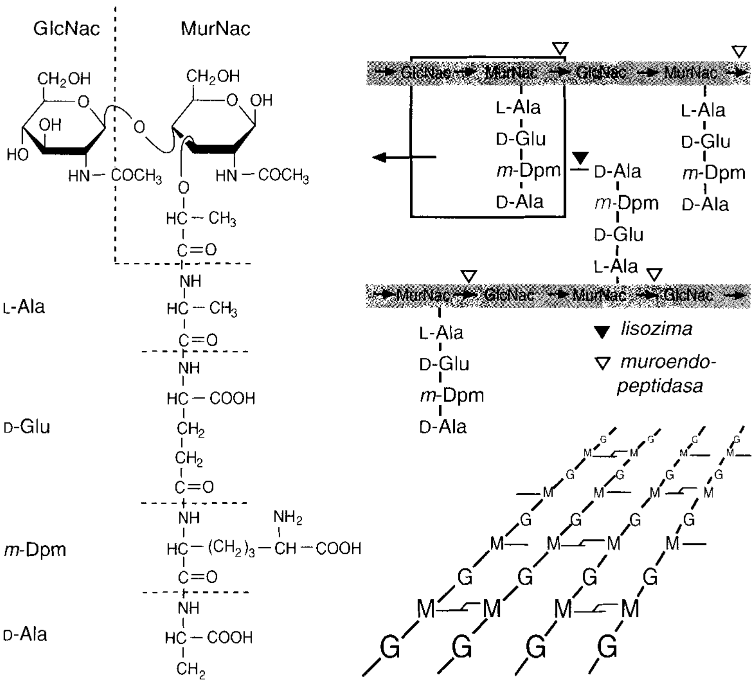

GlcNac
MurNac
CH_2OH
OH
HO
HN–COCH$_3$
O
HC–CH$_3$
C=O
NH
L-Ala
D-Glu
m-Dpm
D-Ala
HC–COOH
CH$_2$
NH$_2$
HC–(CH$_2$)$_3$–CH–COOH
GlcNac
MurNac
▼ *lisozima*
▽ *muroendo-peptidasa*
G
M

Fig. 2.25 Estructura de la mureína de *Escherichia coli*. Las cadenas de heteropolímeros formadas por una secuencia alternante de *N*-acetilglucosamina (GlcNac) y ácido *N*-acetilmurámico (MurNac) están unidas entre sí por enlaces peptídicos. En la parte izquierda de la figura se representa aumentado el muropéptido encuadrado en la parte derecha. Las flechas rojas señalan los enlaces hidrolizados por la *lisozima* (*muramidasa*) y por una *muroendopeptidasa* específica. La figura inferior a la derecha da una representación en perspectiva de las cadenas formadas por GlcNac (G) y MurNac (M) y sus interconexiones.

Gram positivas se diferencian de las Gram negativas tanto en lo que se refiere a la constitución del esqueleto básico como a las sustancias accesorias de la pared celular.

La pared celular de las bacterias Gram positivas. En las bacterias Gram positivas la red de mureína supone del 30 al 70% del peso seco de la pared celular (40 capas de grosor). En lugar de ácido *meso*-diaminopimélico es frecuente la presencia de ácido LL-diaminopimélico o de lisina. En *Staphylococcus aureus* las cadenas tetrapeptídicas del ácido murámico están unidas por cadenas interpeptídicas (p. ej. cadenas de pentaglicina). Los aminoácidos implicados varían de una especie a otra. La constitución del esqueleto es característica de la especie y constituye una buena característica taxonómica. En la pared celular de las bacterias Gram positivas los polisacáridos, en el caso de que los haya, están unidos por enlaces covalentes. El contenido proteico es bajo. Con frecuencia se encuentran ácidos teicoicos; son cadenas de moléculas de glicerina o ribitol esterificadas entre sí por puentes fosfato. Los ácidos teicoicos se unen probablemente a la mureína a través del fosfato formando una amida.

La pared celular de las bacterias Gram negativas. En las bacterias Gram negativas la red de mureína presenta una sola capa (Fig. 2.25) y supone menos del 10% del peso seco de la pared celular (en *Escherichia coli* B). La mureína contiene siempre únicamente *meso*-diaminopimélico y nunca lisina, y no se encuentran puentes interpeptídicos. La constitución del saco de mureína es igual en todas las bacterias Gram negativas. Junto a este esqueleto se encuentran grandes cantidades de lipoproteínas, lipopolisacáridos y otros lípidos, que parecen estar pegados a la estructura de mureína. Están unidos covalentemente y representan hasta el 80% del peso seco de la pared celular. Parece ser que para mantener la estabilidad de la capa de lipopolisacáridos es imprescindible el ión Ca^{2+}. En muchas bacterias Gram negativas la capa de mureína se hace accesible al enzima *lisozima* que la destruye, cuando se han tratado con EDTA para eliminar los iones Ca^{2+}. Este agente quelante libera una parte de los lipopolisacáridos. Hasta ahora no han podido demostrarse ácidos teicoicos.

Acción de la lisozima y la penicilina. El esclarecimiento de la estructura de la pared celular y de la mureína debe agradecerse en primer lugar a la investigación de la acción de la *lisozima* y la penicilina sobre las bacterias. La *lisozima* descubierta por FLEMING (1922) es un enzima bactericida que se encuentra en el líquido lagrimal, secreciones nasales y en la clara de huevo; también se ha aislado *lisozima* de bacterias (*Escherichia coli, Streptomyces*) y bacteriófagos. La acción de la *lisozima* sobre una suspensión de bacterias Gram positivas se manifiesta por un aclaramiento rápido de la suspensión. *Micrococcus luteus* (*lysodeikticus*) ya se lisa con 1 µg de *lisozima*/ml. Para lisar células de *Bacillus megaterium* hacen falta 50 µg/ml y muchas bacterias Gram negativas se lisan únicamente cuando se añaden agentes quelantes (EDTA).

La *lisozima* rompe el enlace glucosídico de la mureína entre el átomo del C1 del ácido acetilmurámico, y el C4 de la *N*-acetilglucosamina, y descompone la cadena mucopolisacárida al disacárido GlcNac-MurNac (véase Fig. 2.25). La *lisozima* es por tanto una *(N-acetil-)muramidasa.*

Puede impedirse la lisis total de las células bacterianas si se deja que el proceso tenga lugar en una solución isotónica o ligeramente hipertónica de

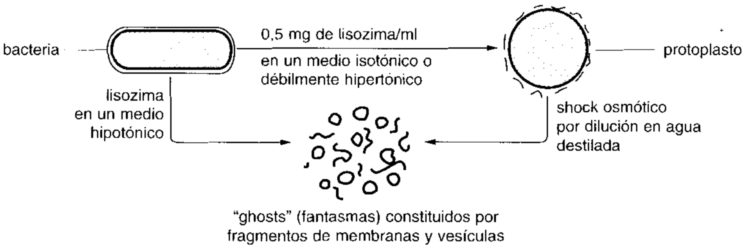

bacteria
0,5 mg de lisozima/ml
en un medio isotónico o
débilmente hipertónico
protoplasto
lisozima
en un medio
hipotónico
shock osmótico
por dilución en agua
destilada
"ghosts" (fantasmas) constituidos por
fragmentos de membranas y vesículas

Fig. 2.26 Obtención de protoplastos y vesículas de membranas mediante el tratamiento con lisozima.

sacarosa (0,1-0,2 molar). Entonces por acción de la *lisozima* se forman **"protoplastos"** redondeados (Fig. 2.26) que son extraordinariamente sensibles a la presión osmótica. Son estables en medios hipertónicos e isotónicos; en medios hipotónicos estallan y dan lugar a los llamados "ghosts" ("fantasmas", restos de la membrana citoplasmática). Deben llamarse protoplastos únicamente a aquellas células redondeadas en las que se ha comprobado que no tienen restos de pared celular, en las que por tanto no puede demostrarse la presencia de ácido murámico ni del aminoácido de la pared celular ácido diaminopimélico, no presente en las proteínas. La pérdida de la pared celular no influye en el metabolismo; los protoplastos respiran igual que las células intactas, esporulan si el proceso de esporulación se había iniciado anteriormente, pero los fagos no se adsorben.

Además de la *lisozima* existe un gran número de enzimas capaces de destruir la estructura de la mureína. La mayoría de las muroendopeptidasas obtenidas a partir de bacterias rompen con gran especificidad los enlaces peptídicos de las uniones transversas. Una *endopeptidasa* aislada de *E. coli* rompe la unión D-alanil-*m*-Dpm (indicado en Fig. 2.25). Otros enzimas rompen en otros puntos.

El antibiótico penicilina actúa principalmente sobre bacterias Gram positivas (estafilococos y neumococos), pero también sobre muchas células Gram negativas (gonococo, meningococo, Enterobacteriáceas) matándolas. Esta acción bactericida se reduce exclusivamente a las bacterias en crecimiento; las células en reposo no resultan en absoluto afectadas. La modificación más notable que se observa como consecuencia de la acción de la penicilina es la formación de formas L, que surgen a partir de las células tratadas por un crecimiento en longitud y grosor desordenados, y que llegan a tener un tamaño varias veces superior al del bacilo que las ha originado (pág. 134). Sobre medios de cultivo con agar estas células gigantes son viables durante un cierto tiempo. Si se deja actuar la penici-

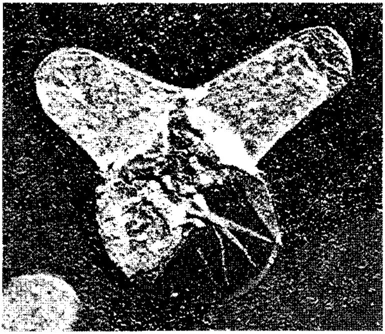


Fig. 2.27 *Escherichia coli* tras un tratamiento con penicilina. Preparación después de una acción de 90 min de 100 u de penicilina/ml de medio de cultivo. 9000 aumentos (Foto H. FRANK).

lina sobre células en crecimiento en un medio de cultivo hipotónico estas células estallan. En un medio de cultivo isotónico o hipertónico, los bacilos se transforman en esferas (Fig. 2.27), que se denominan formas L o "esferoplastos". Estos últimos se diferencian de los protoplastos por la presencia de restos de la pared celular (demostración de ácido murámico y ácido diaminopimélico). La penicilina interfiere en la formación de la pared celular.

Formación de la pared celular. La biosíntesis y la incorporación de los monómeros de la mureína en la estructura del glucopéptido pueden ordenarse en tres fases (Fig. 2.28). Los primeros pasos biosintéticos tienen lugar en el citoplasma. Ahí se forma el ácido murámico-pentapéptido. La síntesis parte de la *N*-acetilglucosamina-1-fosfato; en pasos enzimáticos sucesivos se forma el éter láctico y a él se unen los cinco aminoácidos. Durante este proceso la molécula en crecimiento permanece unida al UDP que actúa de portador. La unión del ácido murámico-pentapéptido con la *N*-acetilglucosamina y la adición de los cinco restos de glicina tienen lugar en la segunda fase de la síntesis en la membrana citoplasmática. Para introducir estas transformaciones se convierte la molécula hidrófila en lipófila. Esto tiene lugar gracias a un cambio del UDP por un polisoprenoide de 55 carbonos (C_{55}), el undecaprenil-fosfato. Esta unión posibilita también el transporte del componente terminado de la pared celular a través de la membrana citoplasmática. En la tercera fase se incorpora a la estructura del glucopéptido y se forma el enlace peptídico. El enlace transversal se establece por transpeptidación, esto es, se rompe la unión entre los dos restos de D-alanina y el grupo carboxilo liberado se une al grupo amino de la lisina de otro oligopéptido. La D-alanina del extremo se libera. En esta incorporación queda también libre el undecaprenil-difosfato; se hidroliza, y el undecaprenilmonofosfato vuelve al ciclo. El lípido actúa también como transportador en la síntesis de otros polímeros localizados por fuera de la membrana citoplasmática, como polisacáridos, lipopolisacáridos y celulosa.

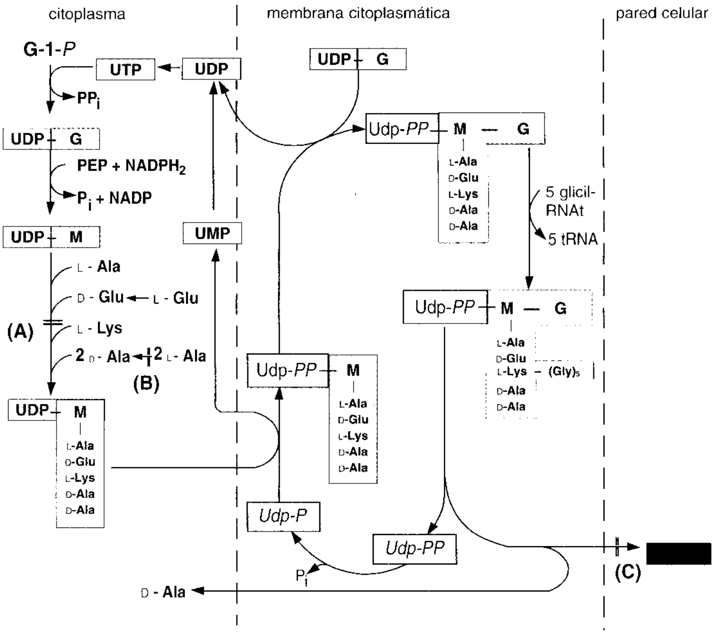

citoplasma
membrana citoplasmática
pared celular
G-1-P
UTP
UDP
PPi
UDP-G
PEP + NADPH2
Pi + NADP
UDP-M
UMP
L-Ala
D-Glu
L-Glu
L-Lys
2 D-Ala
2 L-Ala
(A)
(B)
UDP-M
L-Ala
D-Glu
L-Lys
D-Ala
D-Ala
UDP-G
Udp-PP-M — G
L-Ala
D-Glu
L-Lys
D-Ala
D-Ala
5 glicil-RNAt
5 tRNA
Udp-PP-M — G
L-Ala
D-Glu
L-Lys – (Gly)5
D-Ala
D-Ala
Udp-PP-M
L-Ala
D-Glu
L-Lys
D-Ala
D-Ala
Udp-P
Udp-PP
Pi
D-Ala
(C)

Fig. 2.28 Biosíntesis de la mureína de *Staphylococcus aureus*. Las tres fases de la síntesis se indican por líneas discontinuas. Tienen lugar en el citoplasma, en la membrana citoplasmática y en la pared celular. G = GlcNac = *N*-acetilglucosamina, M = Mur = Nac = ácido *N*-acetilmurámico, Udp = undecaprenil. La síntesis de la pared celular no se realiza cuando (A) no hay ningún diaminoácido (lisina) disponible, (B) cuando se inhibe la racemización de L-alanina a D-alanina y su unión peptídica mediante la C-cicloserina (= oxamicina), o (C) cuando se impide el establecimiento del puente interpeptídico entre las cadenas mediante la penicilina.

La penicilina no interfiere en la síntesis de los componentes de la mureína, sino que impide la unión transversal por transpeptidación, pero no la prolongación por transglucosidación del heteropolímero. Como consecuencia, algunas bacterias cuando actúa la penicilina excretan el compuesto previo UDP-ácido murámico pentapéptido y filamentos de glucopéptido no entrelazados. Del mismo modo actúan sobre la formación de la pared celular derivados de la penicilina, como cefalosporina, ristocetina, vancomicina, bacitracina y cicloserina. También se forman esferoplastos por acción de glicina, D-aminoácidos, o por "lisis anaeróbica".

Las capas externas de las paredes celulares de bacterias Gram negativas. En las bacterias Gram negativas se superpone una capa externa de la pared celular al saco de mureína que consta de una o dos capas como máximo. En cortes finos de bacterias se reconoce una capa semejante a la de la membrana citoplasmática; por ello se habla también de una **membrana externa**. Esta capa externa de la pared es de composición compleja y cuenta con proteínas, fosfolípidos y lipopolisacáridos (Fig. 2.29).

A la capa de mureína se unen lipoproteínas, aparentemente de forma covalente a través del ácido diaminopimélico; los extremos lipófilos se dirigen hacia el exterior y quedan así anclados en una doble capa lipófila (por interacciones hidrofóbicas). Ésta contiene fosfolípidos y los extremos hidrófilos de los polisacáridos. Los extremos hidrófilos de los lipopolisacáridos se dirigen hacia afuera.

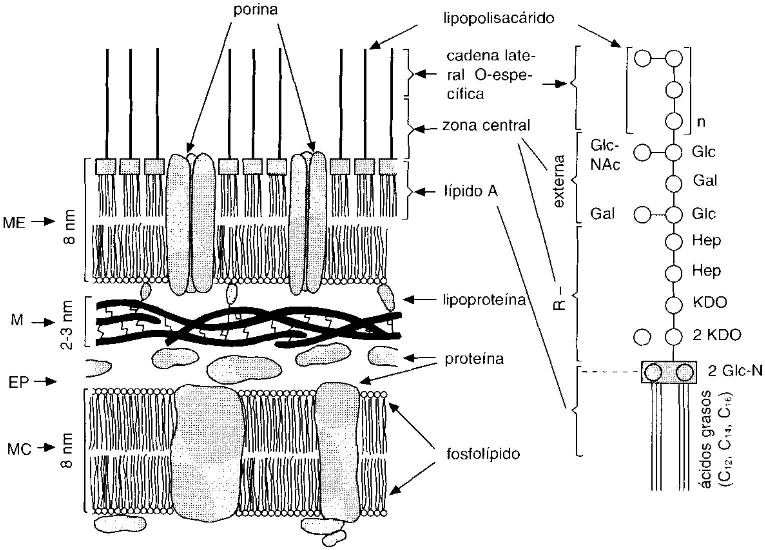

porina
lipopolisacárido
cadena lateral O-específica
zona central
lípido A
lipoproteína
proteína
fosfolípido
ME
M
EP
MC
8 nm
2-3 nm
8 nm
externa
R –
Glc-NAc
Gal
n
Glc
Gal
Glc
Hep
Hep
KDO
2 KDO
2 Glc-N
ácidos grasos (C_{12}, C_{14}, C_{16})

Fig. 2.29 Modelo de la constitución de la pared celular de bacterias Gram negativas. La capa de mureína limita inmediatamente con la membrana citoplasmática. Los extremos hidrófilos de las lipoproteínas están unidos a ella covalentemente. Estas últimas se introducen con sus extremos lipófilos en una doble capa lipídica, que contiene fosfolípidos y las zonas lipídicas A de los lipopolisacáridos. Las cadenas hidrófilas, heteropolisacáridas específicas de los antígenos O de los lipopolisacáridos salen hacia afuera (arriba). A la derecha se indica una molécula lipopolisacarídica. Símbolos: Glc = glucosa, Glc-N = glucosamina, GlcNAc = *N*-acetilglucosamina, Gal = galactosa, Hep = heptosa, KDO = ácido 2-ceto-3-desoxioctónico, MC = membrana citoplasmática, M = mureína, ME = membrana externa, EP = espacio periplásmico.

Los lipopolisacáridos son las endotoxinas de las bacterias Gram negativas. Los lipopolisacáridos (LPS) han adquirido gran importancia en el diagnóstico bacteriológico y en la identificación de infecciones. Distintas cepas de *Salmonella typhimurium*, *Shigella dysenteriae* y otros causantes de enfermedades intestinales se diferencian entre sí por las llamadas cadenas laterales O específicas, que representan la capa externa de la pared celular. Diferencias muy pequeñas en la composición de esta capa pueden ponerse de manifiesto por métodos inmunológicos. Mediante reacciones inmunológicas se han diferenciado más de 1000 especies y cepas en el género *Salmonella*. El análisis químico ha confirmado las diferencias caracterizadas serológicamente (WESTPHAL). Entre las salmonelas existen razas locales que pueden reconocerse por sus características inmunoquímicas. De este modo puede localizarse dónde ha tenido lugar una infección de un enfermo, o localizarse el foco de una epidemia; así puede determinarse si un enfermo ha contraído una diarrea, por ejemplo, en una ciudad sudamericana o del este asiático.

Las cepas bacterianas aisladas de la naturaleza o de enfermos crecen sobre agar generalmente como colonias lisas, brillantes (smooth; por ello, formas S); la superficie regular contiene mucha agua debido a la presencia de las cadenas polisacarídicas O-específicas. Estas formas S mutan espontáneamente a formas R, que en general dan colonias rugosas (rough) y planas (Fig. 2.30). Las cadenas de polisacáridos dan aparentemente a las bacterias una ventaja selectiva. En el hospedador animal son por ejemplo más resistentes a la fagocitosis por los leucocitos y por ello más virulentas. Hasta que el hospedador no forme anticuerpos y éstos se unan a los poli-

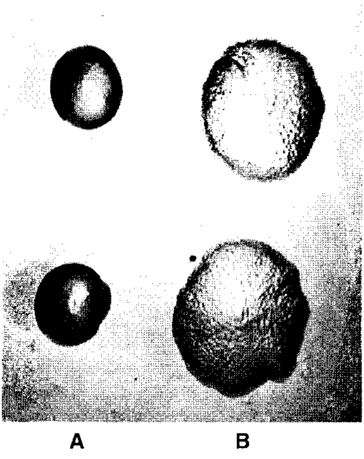


Fig. 2.30 Formas coloniales de *Salmonella paratyphi* B. A forma S, **B** forma R (Foto E. KRÖGER).

sacáridos, las bacterias no son atacables. La gran variedad de polisacáridos O-específicos en bacterias patógenas puede deberse a una selección de tipos O-antigénicos (mutantes) nuevos cada vez; tienen por tanto una ventaja en el desarrollo, porque el hospedador no puede disponer simultáneamente de los anticuerpos contra cientos de antígenos. Los lipopolisacáridos son una de las endotoxinas más activas de las bacterias, y provocan fiebre, diarreas y disentería.

Se han estudiado profundamente los lipopolisacáridos de *Salmonella typhimurium* y otras Enterobacteriáceas. Se diferencian tres fragmentos: lípido A, zona central y cadenas laterales O-específicas (Fig. 2.29). El lípido A consta de un glucosamina-disacárido, cuyos grupos hidroxilo están esterificados por ácidos grasos de 12, 14, y 16 carbonos; esta parte determina las características hidrofóbicas. Hacia afuera se encuentra a continuación la zona central R, compuesta por un trisacárido de ácido 2-ceto-3-desoxioctónico (KDO), que también está unido a fosfoetanolamina, y le siguen dos moléculas de heptosa y la zona central externa. Esta última se compone de una cadena ramificada de glucosa, galactosa y *N*-acetilglucosamina. Esta estructura básica se presenta en todas las salmonelas uniformemente. En los mutantes R el trisacárido KDO representa el límite externo; no se han aislado nunca mutantes sin KDO, por lo que no deben ser viables. Las cadenas laterales O-específicas siguen a la zona central. Están compuestas por cadenas largas de oligosacáridos que se repiten; éstos contienen galactosa, manosa, ramnosa, abecuosa, fucosa, colitosa y otros azúcares con una composición que varía de una cepa a otra. Los extremos C1 (reductores) de los azúcares están orientados hacia dentro. Esta cadena heteropolisacarídica externa es específica de cepa y representa a los antígenos O (somáticos; pág. 69). Posibilita la identificación de una cepa con ayuda de los métodos inmunoquímicos anteriormente mencionados.

Función de la membrana externa. La membrana externa de las bacterias Gram negativas no tiene sólo una función mecánica, sino que también cumple con funciones fisiológicas esenciales.

En la doble capa lipídica compuesta por el lípido A del lipopolisacárido y los fosfolípidos se incluyen proteínas, que atraviesan la doble capa en todo su espesor. Hay que imaginarse a estas proteínas transmembrana como canales llenos de agua o poros hidrófilos en la membrana lipófila; por ello se denominan **porinas**. Existen varias porinas distintas. Permiten el paso de sustancias hidrófilas de bajo peso molecular (hasta una masa relativa de 6000).

El espacio periplásmico. El espacio entre la membrana citoplasmática y la capa de glucopéptido, denominado espacio periplásmico, contiene en muchas bacterias gran número de enzimas, por ejemplo aquellos que inician la degradación de sustratos (metanol, glucosa) o la transformación de compuestos inorgánicos (SO_4^{2-}, NO_3^-). Algunos de estos enzimas están anclados en la membrana citoplasmática, otros están totalmente libres. También se localizan aquí *despolimerasas* de proteínas, polisacáridos, ácidos nucleicos y otros biopolímeros, así como proteínas de unión, que actúan como receptores de estímulos quimiotácticos y para el transporte de ciertas sustancias al interior del citoplasma. El espacio periplásmico contiene probablemente una densidad tan alta de proteínas funcionales como el protoplasto.

2.2.5 Cápsulas y limos

Sobre las paredes celulares de muchas bacterias se depositan capas más o menos gruesas de un material muy rico en agua: cápsulas y limos. A pesar de que estas capas no son vitales para las bacterias, el disponer de una cápsula hace que algunas bacterias patógenas sean resistentes a la fagocitosis e incrementa su virulencia.

Cápsulas. Después de añadir colorantes como nigrosina, rojo congo o tinta china, que no penetran en la cápsula, se demuestra la presencia de cápsula al microscopio óptico. Es una tinción negativa; las cápsulas aparecen claras sobre un fondo oscuro (Fig. 2.31 y 2.32). Las cápsulas menos gruesas de los neumococos se visualizan añadiendo el antisuero homólogo,

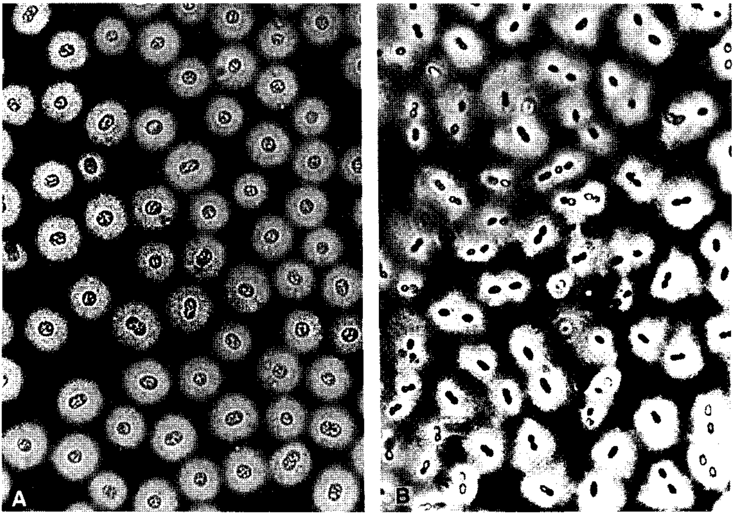


Fig. 2.31 Cápsulas bacterianas. Representadas por la bacteria roja del azufre *Amoebobacter roseus* (**A**) y la bacteria fijadora de N_2 *Azotobacter chroococcum* (**B**). Preparaciones con tinta china: (A) 1200 aumentos (Foto N. Pfennig); (B) 500 aumentos (Foto D. Claus).

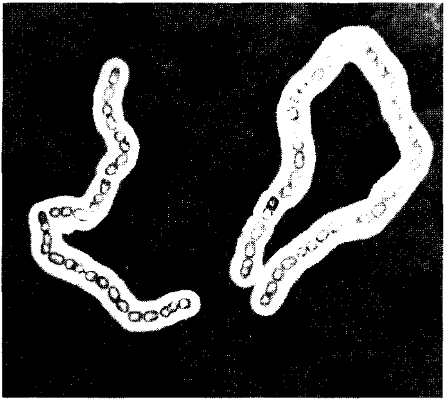


Fig. 2.32 Cápsulas bacterianas. Puestas de manifiesto en cadenas de células de *Bacillus megaterium* suspendidas en tinta china. La sustancia capsular se destaca como una zona clara en el fondo oscuro de las partículas negras de tinta china; fotografía en contraste de fases, 1000 aumentos (Foto G. Bohlken, Tesis, Göttingen 1965).

con la consiguiente adhesión de las proteínas del anticuerpo. Este proceso tiene el aspecto de un hinchamiento por hidratación ("reacción de hinchamiento", "Quellungsreaktion" de Neufeld). La mayoría de las cápsulas están compuestas por polisacáridos (*Streptococcus mutans*, *Streptococcus salivarius*, *Xanthomonas*, corinebacterias) que contienen, además de glucosa: aminoazúcares, ramnosa, ácido 2-ceto-3-desoxigalactónico, ácidos urónicos de los azúcares y ácidos orgánicos como el pirúvico y el acético. Las cápsulas de algunas especies de *Bacillus* (*B. anthracis*, *B. subtilis*) son de polipéptidos, en primer lugar de ácido poliglutámico.

Limos. Muchas sustancias capsulares se ceden al entorno en forma de limos. Ocasionalmente las cápsulas pueden separarse de la superficie celular por agitación u homogeneización de una suspensión bacteriana, y entonces se pueden extraer del medio de cultivo como limos.

Cuando el medio de cultivo contiene sacarosa, muchos microorganismos forman limos de una forma más acusada. Un ejemplo conocido lo ofrece *Leuconostoc mesenteroides* (conocido en las azucareras como "Froschlaichbacterium" –"bacteria de desove de ranas"–), una bacteria heterofermentativa del ácido láctico, que transforma en poco tiempo las disoluciones de azúcar de caña en gelatina, compuesta por dextrano. Esta transformación tiene lugar fuera de la célula y está catalizada por una *hexosiltransferasa*, la *dextransacarasa*.

$$n \text{ sacarosa} + (1{,}6\text{-}\alpha\text{-glucosil})_m \longrightarrow n \text{ fructosa} + (1{,}6\text{-}\alpha\text{-glucosil})_{m+n}$$

El dextrano es un polisacárido en el que la α-D-glucosa se une por enlaces 1,6 (1,6-α-glucano). Las cadenas paralelas están entrelazadas. El dextrano se utiliza como sustituto del plasma sanguíneo, para elevar la vis-

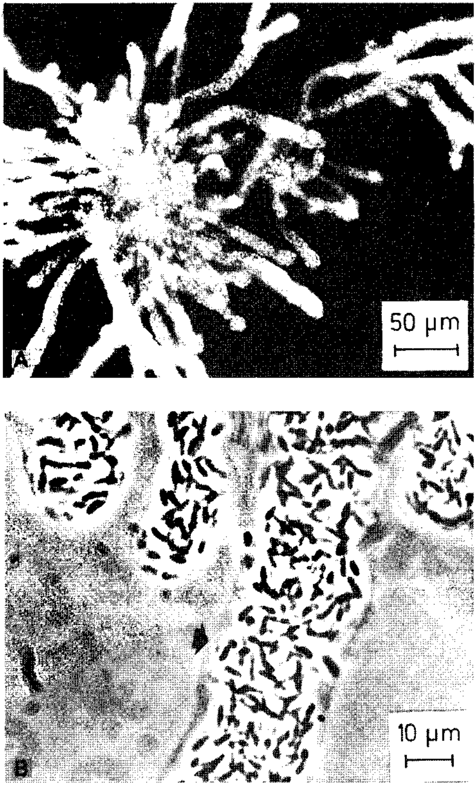


Fig. 2.33 Estructura colonial de *Zoogloea ramigera*. **A** Forma colonial típica. **B** Las células quedan incluidas en una sustancia mucosa (de Unz, R.F., N.C. Dondero: Canad. J. Microbiol. 13 [1967] 1671).

cosidad de disoluciones acuosas y como base de los geles de dextrano (sephadex).

Los estreptococos causantes de la caries dental, entre ellos *Streptococcus mutans* y *S. salivarius* excretan otra hexosiltransferasa, que transforma la sacarosa en polifructosas (levanos). Los polisacáridos se fijan fuertemente, por ejemplo en la superficie de los dientes, y constituyen la matriz en la que se acumulan los productos ácidos de la fermentación de los estreptococos, sobre todo el ácido láctico.

Vainas. Se denominan vainas a las cubiertas tubulares de bacterias filamentosas, las llamadas bacterias con vaina (*Sphaerotilus natans* y *Leptothrix ochracea*). Están compuestas por un heteropolisacárido (glucosa, ácido glucurónico, galactosa y fucosa).

Una excreción de limos orientada polarmente en forma de un pedúnculo permite a algunas bacterias un modesto cambio de posición (*Gallionella ferruginea*); los limos mantienen también en grupos a los seres unicelulares (*Zoogloea ramigera*; Fig. 2.33), o en películas superficiales (*Bacterioglea*). *Acetobacter aceti* subsp. *xylinum* excreta celulosa, que mantiene unidas a las células en una película superficial de consistencia semejante al cuero ("mycoderma aceti").

Las células de *Sarcina ventriculi* (Fig. 2.34) y *Lampropedia hyalina* se mantienen gracias a celulosa en agrupaciones de forma regular (agregados). La celulosa actúa aquí como una sustancia cementante, y se diferencia de las cápsulas por su estructura y función. La pérdida de la formación de celulosa por mutación no afecta al crecimiento de los microorganismos.

Biosíntesis. Los polisacáridos localizados por fuera de la pared celular se reúnen bajo el nombre de exopolisacáridos. Según sus propiedades físicas se diferencia entre cápsulas y limos. Si los exopolisacáridos están unidos de forma relativamente fuerte a la pared celular se habla de cápsula; si se encuentran unidos de forma débil o si son libres se habla de limos.

Desde el punto de vista de la biosíntesis de los exopolisacáridos hay que diferenciar dos mecanismos: 1. Los dextranos y los levanos se forman a partir de disacáridos mediante enzimas extracelulares. 2. La composición de la mayoría de los exopolisacáridos es independiente del sustrato de las

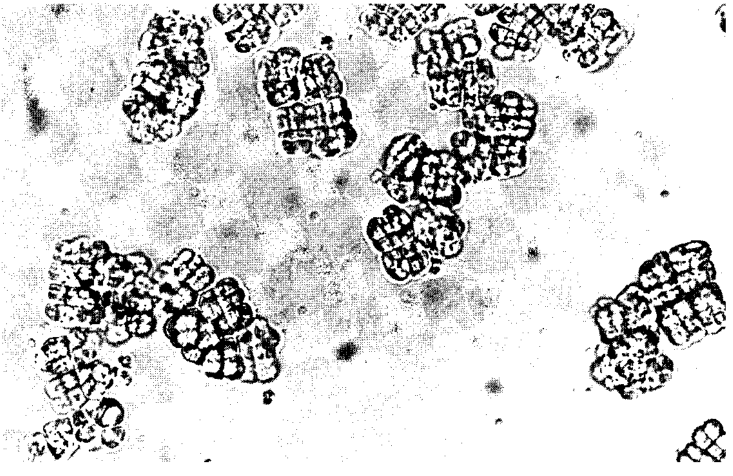


Fig. 2.34 ***Sarcina ventriculi*, paquetes de células de un crecimiento en medio líquido.** Fotografía en campo claro, 750 aumentos (Foto D. Claus).

células. La vía biosintética es semejante a la de la mureína y a la de los lipopolisacáridos. En los tres procesos participan el UTP y el lípido undecaprenil-difosfato (C_{55}-polisoprenoide). Los azúcares activados por el UTP (UDP-azúcar) son captados por el lípido como transportador, se incorporan a las unidades básicas del homo o heteropolímero específico de la especie, y son transportados desde el protoplasto hasta las capas externas de la pared celular, donde se unen al exopolisacárido macromolecular.

2.2.6 Flagelos y motilidad

La motilidad de las bacterias puede efectuarse de diversos modos. En la mayoría de las bacterias activamente móviles, nadadoras, el movimiento tiene su origen en la rotación de flagelos. El movimiento sin flagelos lo presentan las bacterias deslizantes, entre las que se encuentran las mixobacterias, cianobacterias y otros pocos grupos, así como las espiroquetas. Los mecanismos de movimiento de estas bacterias se tratarán al discutir cada uno de los grupos bacterianos indicados.

Disposición de los flagelos. La disposición de los flagelos en la célula bacteriana es una propiedad característica para las eubacterias móviles y tiene por tanto valor taxonómico. En una bacteria bacilar los flagelos pueden insertarse **polar** o **lateralmente** (Fig. 2.35). Entre las bacterias de flagelación monopolar hay pocas que tengan un solo flagelo, pero entonces es especialmente grueso (monotricos; *Vibrio metchnikovii*, Fig. 2.36; *Caulobacter* sp.). El único flagelo que presentan muchas bacterias de flagelación monopolar y bipolar, y que funciona como un solo flagelo, está compuesto en realidad por 20-50 flagelos en un penacho (politrico). En el caso de las bacterias de flagelación monopolar politrica se habla también de **lofotricos** (*Pseudomonas*, *Chromatium*) y en los bipolares politricos de **anfitricos** (*Spirillum*). *Selenomonas* dispone de un penacho de flagelos insertados lateralmente (Fig. 2.37B). En las bacterias de flagelación **peritrica** (Enterobacteriáceas, Baciláceas, entre otras) los flagelos se insertan en los costados de las células o en todo su contorno (Fig. 2.37A).

Visualización de los flagelos. Sólo en pocas bacterias puede verse el flagelo (o el penacho de flagelos) en el microscopio de campo claro o de contraste de fases, por ejemplo *Chromatium okenii*, *Bdellovibrio*, *Thiospirillum* (Fig. 2.38). En otras muchas bacterias los flagelos y sus oscilaciones sólo pueden verse con iluminación de campo oscuro (*Pseudomonas*, *Spirillum*). La forma más fácil de verlos es por deposición de un colorante o de un metal, además de la microscopía electrónica (Fig. 2.39).

Función de los flagelos. En la mayoría de las bacterias de flagelación polar el flagelo actúa como impulsor (como una hélice de barco) y va

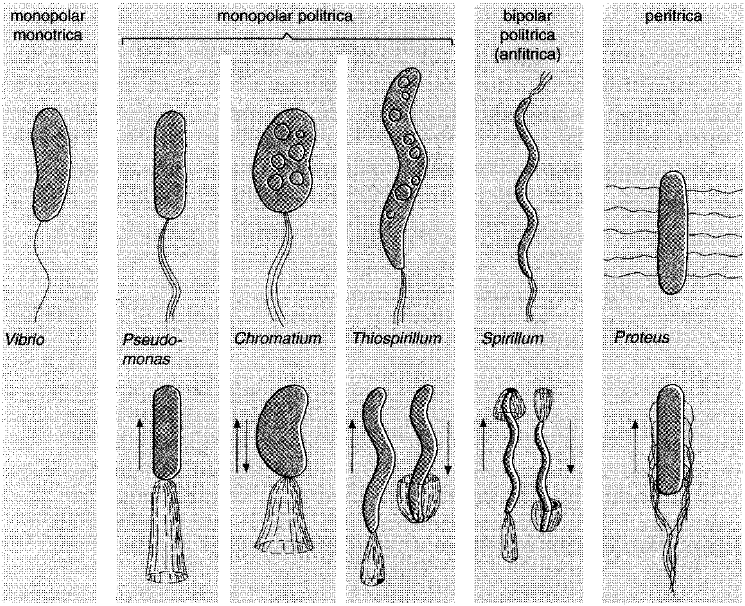

monopolar monotrica
monopolar polítrica
bipolar polítrica (anfitrica)
perítrica
Vibrio
Pseudo-monas
Chromatium
Thiospirillum
Spirillum
Proteus

Fig. 2.35 Esquema de los tipos más importantes de flagelación y de movimiento de las bacterias.

empujando a la célula a través del medio. Los flagelos son filamentos helicoidales impulsados por un "motor de rotación" localizado en la membrana citoplasmática en el lugar de fijación, y que giran alrededor del eje ficticio de la espiral. El movimiento puede basarse en filamentos solos o en penachos de flagelos. La velocidad de rotación de los flagelos es relativamente alta. Los flagelos de espirilos giran a unas 3000 vueltas/min, esto es la velocidad de un motor eléctrico medio. La rotación del flagelo determina que el cuerpo celular de la bacteria gire en sentido contrario a aproximadamente 1/3 de esta velocidad.

Los flagelos pueden invertir el sentido espontáneamente o por acción de un estímulo externo (Fig. 2.35). En algunas bacterias de flagelación polar el cambio de sentido en el giro tiene como consecuencia la inversión en el sentido del movimiento. Si en *Chromatium okenii* se invierte el sentido de giro mediante un estímulo luminoso, el penacho de flagelos actúa por tracción (hélice); la velocidad de este movimiento hacia atrás es tan sólo un cuarto de la velocidad hacia adelante; el movimiento es "tambaleante". En *Thiospirillum jenense*, un espirilo gigante fototrófico de flagelación mo-

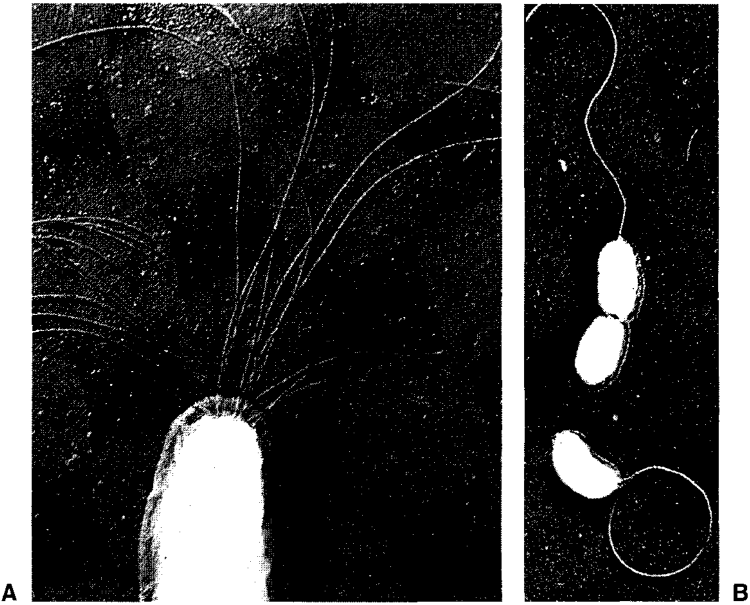


Fig. 2.36 Tipos de flagelación. A *Aquaspirillum serpens*, flagelación polar politrica; **B** *Vibrio metchnikovii*, flagelación polar monotrica. Micrografías electrónicas a 11 000 (A) y 7100 (B) aumentos. Preparación por sombreado metálico (Foto W. Van Iterson).

nopolar, el penacho de flagelos en el movimiento hacia atrás no queda hacia adelante, sino que la oscilación tiene lugar por encima de la célula bacteriana (de forma semejante a como queda un paraguas en una tormenta). En los espirilos de flagelación anfitrica hay un penacho de flagelos doblado que gira alrededor del cuerpo celular.

Los flagelos de ordenación peritrica de *Escherichia coli* funcionan como un conjunto helicoidal perfectamente coordinado impulsando las células a través del medio. Cuando se invierte el sentido de giro de cada uno de los flagelos se inicia el movimiento tambaleante. Los flagelos peritricos no parecen poder actuar por tracción.

Las bacterias flageladas pueden alcanzar altas velocidades: *Bacillus megaterium* 1,6 mm/min, y *Vibrio cholerae* 12 mm/min. Esto corresponde a 300 o 3000 veces la longitud del cuerpo por minuto.

Ultraestructura de los flagelos. Los flagelos son filamentos enrollados helicoidalmente. Los flagelos de las distintas bacterias se diferencian en su

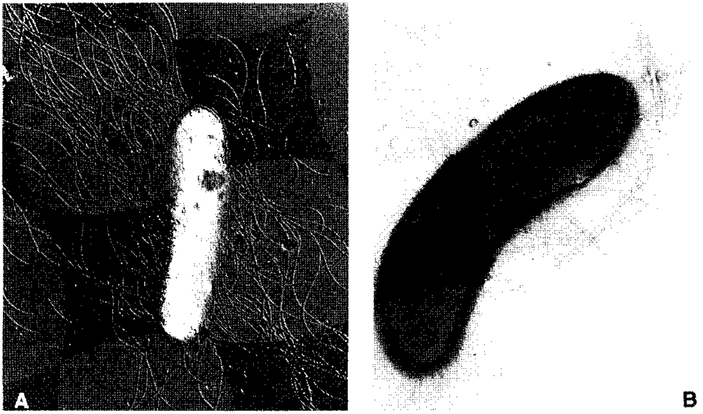


Fig. 2.37 Tipos de flagelación. A *Proteus mirabilis*, flagelación peritrica; **B** *Selenomonas ruminantium*, flagelación lateral. Micrografías electrónicas (A) sombreado metálico con platino y paladio, 9500 aumentos (Foto H. FRANK) y (B) tinción negativa, 4080 aumentos (Foto V. KINGSLEY).

grosor (12-18 nm), longitud (hasta 20 µm), así como en la longitud de onda y en la amplitud de la espiral. Estos parámetros son característicos de cada especie. En algunas bacterias pueden presentarse diversos tipos de flagelos.

Los filamentos de los flagelos están compuestos por una proteína específica, la flagelina. Están compuestos por subunidades de un peso molecular relativamente bajo. Estas subunidades están ordenadas de forma helicoidal alrededor de un tubo axial (de modo semejante al virus del mosaico del tabaco, pág. 147). La estructura del flagelo está determinada por las características de sus subunidades proteicas.

Los flagelos se componen de tres partes; el filamento flagelar helicoidal anteriormente descrito, el gancho del flagelo cerca de la superficie celular, y el cuerpo basal. El cuerpo basal fija al flagelo en la membrana citoplasmática y en la pared celular (Fig. 2.40). Está formado por un vástago central que en las bacterias Gram negativas lleva dos pares de anillos. El par más externo (anillos L y P) está a la altura de las capas externa e interna de la pared, el par interno (anillos S y M) está a la altura de la capa externa de la membrana citoplasmática. Como en las bacterias Gram positivas no se presenta el par externo de anillos, se acepta que para la acción del flagelo sólo es imprescindible el par de anillos interno. Se supone que el anillo M actúa como disco motriz y el S como resistencia en la superficie interna de la capa de glucopéptido. El mecanismo molecular del motor rotativo del flagelo aún no está aclarado.

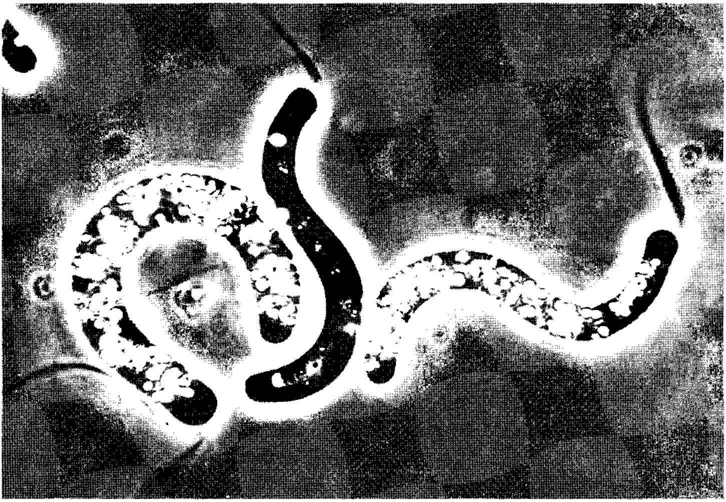


Fig. 2.38 ***Thiospirillum jenense.*** Fotografía en contraste de fases, 1200 aumentos (Foto N. PFENNIG).

Antígenos O y H. *Proteus vulgaris* se extiende frecuentemente sobre toda la superficie de agar formando una película gris y delgada. Este "pulular" se debe a un intenso movimiento. Las células se expanden formando la delgada película ("Hauch" en alemán; forma H). Algunas cepas no forman la película ("Ohne hauch", sin película; forma O); se trata de cepas inmóviles, sin flagelos. De estas observaciones provienen los términos habituales del serodiagnóstico; se denomina a los antígenos de la superficie celular o del cuerpo (somáticos) como antígenos O y a los de los flagelos antígenos H.

Fimbrias y pili. La superficie de algunas bacterias puede estar cubierta por un gran número (de diez a varios miles) de filamentos largos, delgados y rectos, de 3 a 25 nm de diámetro, y hasta 12 μm de longitud, denominados fimbrias o pili. Se presentan tanto en especies flageladas como en variantes sin flagelos. De estos pili del tipo I hay que diferenciar los pili sexuales o pili F. Se han demostrado en células dadoras de *Escherichia coli* K12, esto es, cepas que llevan el factor F (F^+, Hfr). Los pili F sólo se presentan en número de uno o dos por célula; parecen tubos huecos proteicos de 0,5 a 10 μm de longitud.

Quimiotaxis. Las bacterias que pueden moverse libremente están capacitadas para realizar movimientos dirigidos, las taxias o tactismos. Según

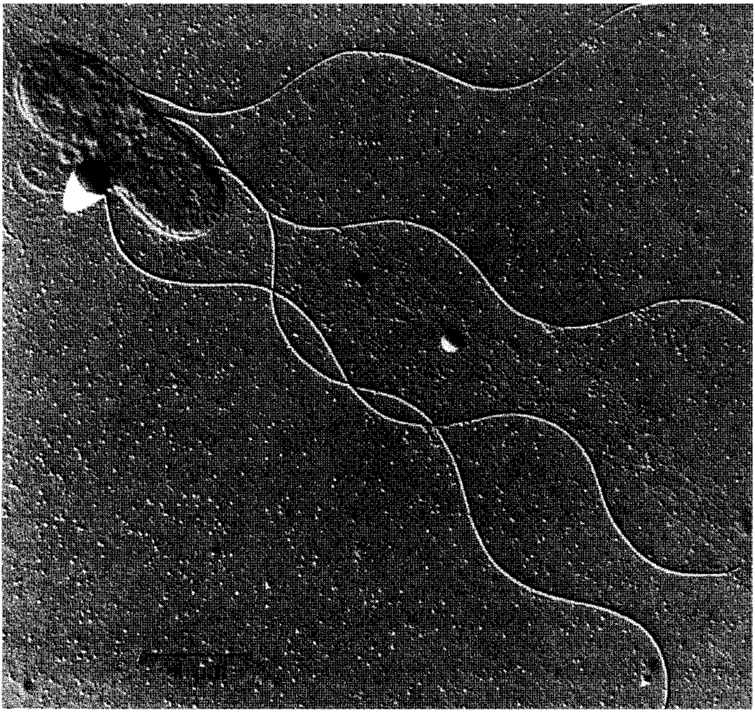


Fig. 2.39 ***Alcaligenes eutrophus*, una bacteria Gram negativa del suelo oxidadora del hidrógeno, con flagelación peritrica degenerada.** (Microfotografía electrónica por tinción con sombreado metálico de platino/iridio: T. Holleman.)

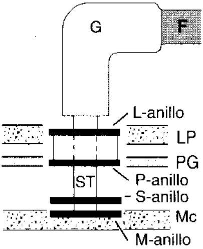


Fig. 2.40 Anclaje del flagelo bacteriano en la pared celular y en la membrana citoplasmática de una bacteria Gram negativa. Símbolos: F = filamento del flagelo, G = gancho del flagelo, Mc = membrana citoplasmática, LP = capa de lipopolisacárido, PG = capa de peptidoglucano, ST = vástago.

cual sea el factor del medio que lo determina se habla de quimiotaxis, aerotaxis, fototaxis y magnetotaxis.

Las bacterias móviles reaccionan frente a estímulos químicos; se reúnen en algunos lugares y huyen de otros. Esta respuesta frente a un estímulo por organismos de movimiento libre se denomina quimiotaxis. Las reuniones causadas por un estímulo químico tienen lugar del siguiente modo (véase Fig. 2.41). Las bacterias de flagelación peritrica pueden desplazarse únicamente de dos modos: natación rectilínea y tambaleo. Este último interrumpe la natación y determina una nueva orientación. Si las bacterias se encuentran en un gradiente de concentración de un sustrato favorable (atrayente) la natación rectilínea se mantiene durante muchos segundos cuando se da en dirección a la concentración óptima y sólo pocos segundos cuando se da en sentido contrario. Aunque el sentido de la natación sea totalmente aleatorio después del movimiento tambaleante, debido a que las duraciones dependen del sentido, se produce una reunión de las bacterias en la región de concentración óptima de sustrato. En las bacterias hay quimiorreceptores responsables de la sensibilidad y de la respuesta frente a un estímulo; son independientes de la captación y asimilación del sustrato. P. ej., hay mutantes que reaccionan quimiotácticamente de forma totalmente normal frente a un nutriente, aunque hayan perdido la capacidad para utilizarlo.

Aerotaxis. Por su movimiento aerotáctico y la reunión a distancias determinadas del borde del cubreobjetos las bacterias móviles manifiestan su tipo fisiológico con respecto al oxígeno. En la capa de bacterias extendidas entre un porta y un cubreobjetos, las bacterias aerófilas se concentran en los bordes del cubre o cerca de burbujas de aire que hayan quedado atrapadas, mostrando de este modo que requieren con-

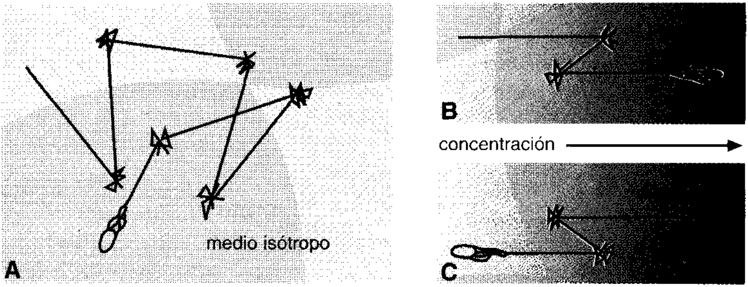


Fig. 2.41 Movimiento quimiotáctico. A En un medio normal (isótropo) la bacteria se mueve linealmente y da tumbos al cabo de unos intervalos de tiempo aproximadamente iguales. **B** En un gradiente de concentración de una sustancia atrayente disminuye la frecuencia con que da tumbos cuando la célula se dirige a la dirección "buena", en dirección al óptimo de concentración. **C** La célula se comporta de forma inversa en un gradiente de una sustancia repelente.

diciones aeróbicas y que consiguen la energía necesaria por respiración aeróbica (Fig. 2.42). Las bacterias anaeróbicas estrictas se concentran en el centro. Las bacterias microaerófilas, por ejemplo algunos pseudomonas y espirilos, mantienen una distancia determinada con respecto al oxígeno del aire. ENGELMANN demostró con ayuda de bacterias con aerotactismo positivo la liberación de oxígeno por cloroplastos iluminados de forma local de la clorofícea *Spirogyra*.

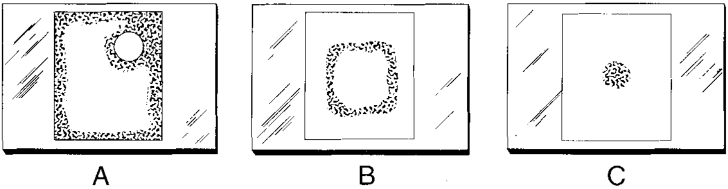


Fig. 2.42 "Figuras de respiración de Beijerinck" consecuencia de la aerotaxis de bacterias móviles. A Las bacterias aeróbicas se acumulan en el borde del cubreobjetos y alrededor de las burbujas de aire, **B** las bacterias microaerófilas mantienen una distancia determinada respecto al borde del cubreobjetos, **C** las bacterias anaeróbicas estrictas se acumulan en el centro (según BEIJERINCK).

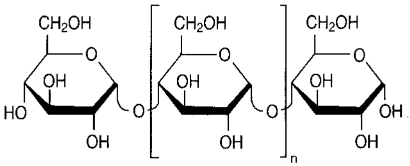
Fototaxis. Las bacterias rojas fototrofas dependen de la luz para obtener energía, por ello van hacia la luz como consecuencia de una reacción fototáctica. Si se proyecta una mancha luminosa sobre una preparación oscura de una suspensión densa de células de *Chromatium* entre porta y cubreobjetos, las células se acumularán en la zona iluminada. Éstas ya no pueden abandonar el campo luminoso cuando han caído en él por su movimiento aleatorio. Al penetrar en la zona oscura se invierte rápidamente el sentido de giro de los flagelos y vuelven a la zona iluminada. El cambio de sentido es tan brusco que se ha descrito como "reacción de terror" (fobotaxis). Por otra parte, la diferencia de luminosidad no tiene que ser grande para determinar esta reacción. Pequeños *Chromatium* se concentran ya en un campo iluminado que presente un 0,7% más de luminosidad que su entorno. Esta sensibilidad para el contraste se aproxima mucho a la del ojo humano (0,4%).

Magnetotaxis. Se han aislado a partir de las capas superficiales de sedimento de cubetas o lagunas de aguas dulces, así como de aguas marinas, bacterias (bacilos, espirilos, cocos) capaces de orientarse en un campo magnético y de nadar en la dirección de las líneas de campo. Estas bacterias contienen mucho hierro (0,4% de la masa seca) que se localiza en forma de gránulos (magnetosomas) de óxido de hierro ferromagnético (magnetita) en la proximidad del anclaje de los flagelos. Las bacterias aisladas del hemisferio norte "buscan" el norte; las líneas de campo transcurren con una declinación de unos 70° hacia abajo. El comportamiento magnetotáctico conduce a las bacterias en profundidad, hacia el sedimento pobre en oxígeno o anóxico. Como las bacterias magnetotácticas son anaeróbicas o microaerófilas, su comportamiento tiene una explicación ecológica. Células transferidas al hemisferio meridional naturalmente desaparecen; no obstante, algunas células con polarización "errónea" sobreviven y se multiplican. La polaridad no parece estar fijada genéticamente.

2.2.7 Materiales de reserva y otras inclusiones celulares

En muchos microorganismos y bajo condiciones ambientales determinadas se almacenan sustancias intracelulares, que pueden considerarse como materiales de almacenamiento o reserva: polisacáridos, grasas, polifosfatos y azufre. Estos materiales se almacenan cuando las sustancias de partida se encuentran en el medio de cultivo, pero el crecimiento está limitado o interrumpido por la falta de nutrientes determinados o por la presencia de inhibidores. Los materiales de reserva citados se encuentran en la célula de forma osmóticamente inerte, son insolubles en agua. Cuando es necesario, en condiciones favorables para el crecimiento, los materiales de reserva vuelven a ser metabólicamente activos. Los polisacáridos de reserva, las grasas neutras y el ácido poli-hidroxibutírico pueden servir como fuente de carbono y de energía, y por tanto para prolongar la vida de la célula en ausencia de una fuente externa de energía, o bien permitir la formación de esporas por los esporulados también en ausencia de sustratos externos. Los polifosfatos pueden considerarse como reservas de fosfato y azufre almacenado como potencial dador de hidrógenos.

Polisacáridos. Los hidratos de carbono de reserva de los microorganismos permanecen aún casi sin investigar químicamente. En algunos microorganismos el polisacárido pudo reconocerse por la coloración con la disolución de yodo (de LUGOL) como **almidón** (azul) o **glucógeno** (pardo). A diferencia de los polisacáridos de la pared, los de reserva proceden siempre de la α-D-glucosa; las moléculas de glucosa se unen entre sí mediante enlaces α-glucosídicos en posición 1,4 y están muy entrelazados (véase también Fig. 14.3).



almidón, glucógeno

Como consecuencia del enlace α-glucosídico, las cadenas de glucosa no son alargadas, sino que se ordenan helicoidalmente. El almidón almacenado en las plantas en forma de gránulos está compuesto por amilosa y amilopectina. La amilosa supone del 20 al 30% (peso) y es la responsable de la reacción entre el yodo y el almidón (coloración azul); ésta se basa en el depósito de yodo entre las vueltas de la hélice (unión por inclusión).

En los clostridios se ha descrito una sustancia semejante al almidón denominada “granulosa” o “yógeno”. Las células de *Clostridium butyricum* están repletas de pequeños gránulos; sólo el polo formador de la espora queda libre de esta “granulosa”. Además *Acetobacter pasteurianum* y muchas especies de *Neisseria* contienen almidón.

El glucógeno, conocido como el “almidón animal”, es semejante a la amilopectina, está mucho más ramificado (posición 1,6) y en las bacterias parece ser más frecuente que el almidón. Se ha demostrado en levaduras y otros hongos, en bacilos (*Bacillus polymyxa*), en *Salmonella*, *Escherichia coli* (Fig. 2.43) y otras Enterobacteriáceas, en *Micrococcus luteus* y en *Arthrobacter*.

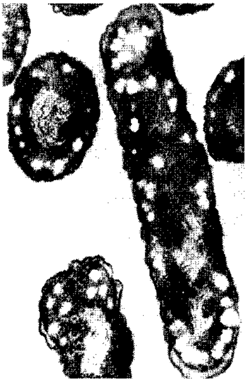
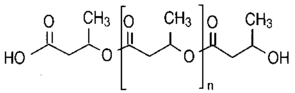


Fig. 2.43 Inclusiones de glucógeno en las células de *Escherichia coli* B. La acumulación de glucógeno se produjo al airear durante 15 horas el tampón fosfato con un 0,5% de glucosa. Micrografía electrónica de un corte ultrafino (tetróxido ósmico-bicromano; acetato de uranilo; 800 aumentos, fotografía de P. Hillmer y F. Amelunxen).

Sustancias lipídicas. Los gránulos y gotitas lipídicas como inclusiones celulares están ampliamente distribuidos entre los microorganismos. Al microscopio óptico se reconocen por su gran refringencia, y pueden teñirse con colorantes lipófilos (sudán III o sudán negro B).

Los gránulos “sudanófilos” de muchas bacterias están compuestos por **ácido poli-β-hidroxibutírico** (PHB), un poliéster soluble en cloroformo e insoluble en éter, formado por cadenas de unos 60 restos de ácido β-hidroxibutírico. Se almacena hasta un 80% del peso seco celular. El ácido poli-β-hidroxibutírico es sintetizado por muchas bacterias aeróbicas (Fig. 2.42), por cianobacterias (Cianofíceas) y por bacterias fototrofas anaeróbicas



ácido poli-ß-hidroxibutírico (n ≃ 60)

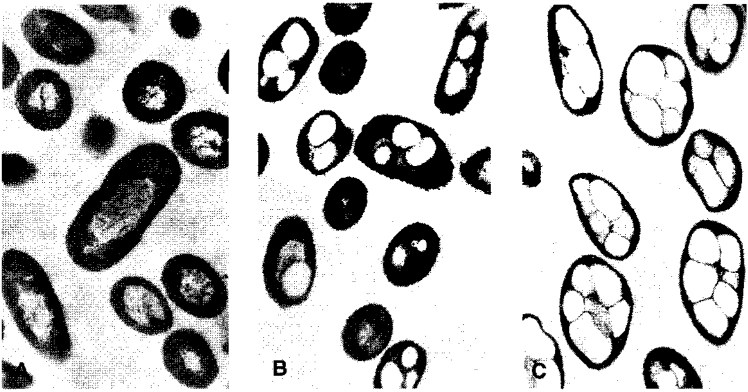


Fig. 2.44 Acumulación de ácido poli-ß-hidroxibutírico en *Alcaligenes eutrophus*. Las células se recogieron en la fase exponencial de crecimiento (**A**) y después de asimilar durante una (**B**) y 24 h (**C**) acetato en ausencia de nitrógeno, y fijadas a continuación. Micrografías electrónicas de cortes ultrafinos (tetróxido ósmico-bicromato; uranilacetato-citrato de plomo); 6000 aumentos (Fotos P. Hillmer y F. Amelunxen).

(Fig. 2.45A). En las bacterias aeróbicas estrictas o facultativas el PHB se acumula cuando las células están bajo déficit de oxígeno y desarrollan un metabolismo fermentativo; el PHB puede considerarse un producto intracelular de la fermentación. Bajo condiciones aeróbicas puede incluirse de nuevo en el metabolismo como fuente de carbono y energía, y respirarse.

En algunas bacterias, además del PHB pueden formarse también otros copolímeros. Por ejemplo, cuando disponen como sustrato de ácido propiónico o de ß-hidroxivaleriánico, se forma un polímero compuesto por ácido ß-hidroxibutírico y ß-hidroxivaleriánico. Como también pueden presentarse γ-hidroxiácidos grasos e hidroxiácidos de cadena larga (C_{18}, C_{10}, C_{12}) se habla actualmente de los polímeros de reserva poli(hidroxi-ácidos grasos) o poli(hidroxialcanoatos) (PHA). Estos PHA son moldeables, termoplásticos y pueden emplearse como nuevos materiales plásticos, que frente al propileno y al polietileno tienen la ventaja de ser biodegradables.

Las **grasas neutras** (triglicéridos) almacenadas especialmente por levaduras y otros hongos en vacuolas tienen una constitución semejante a la de las grasas de organismos superiores. Las levaduras (*Candida*, *Rhodotorula*) pueden almacenar en grasas hasta un 80% del peso seco.

Las micobacterias, nocardias y actinomicetos almacenan otras sustancias grasas en vacuolas. Las micobacterias pueden contener hasta un 40% de ceras (ésteres de ácidos grasos de cadena larga con alcoholes).

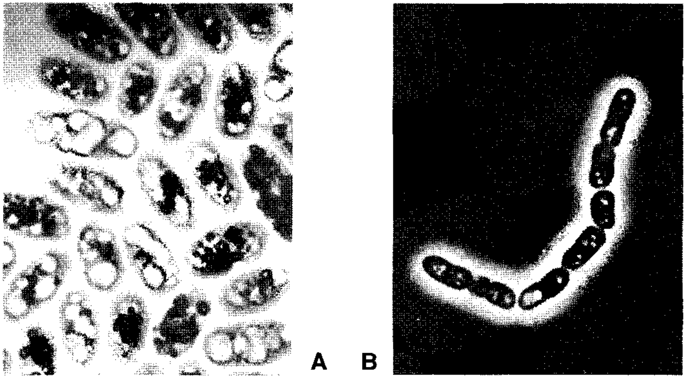
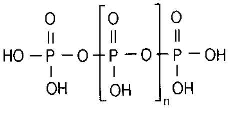


Fig. 2.45 Células con inclusiones de ácido poli-β-hidroxibutírico. A *Chromatium okenii*, **B** *Bacillus megaterium*. Las inclusiones oscuras de *C. okenii* son gotas de azufre. Fotos en campo claro, 1000 aumentos, (B) en una preparación con tinta china (de Schlegel, H.G.: Arch. Mikrobiol. 42 [1962] 110 y G. Bohlken, Tesis, Göttingen 1965).

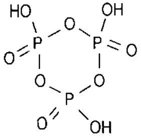
Mientras que el contenido en grasas de reserva es dependiente de las condiciones nutricionales (alta relación C/N), y que pueden aislarse directamente de las células, el contenido en otras fracciones lipídicas es prácticamente independiente de las condiciones del medio. Estos lípidos no se liberan más que después de una hidrólisis de las proteínas y los polisacáridos, y son constituyentes de las lipoproteínas (de la membrana citoplasmática y otras membranas internas) y de los lipopolisacáridos.

Polifosfatos. Muchas bacterias y Clorofíceas pueden almacenar ácido fosfórico en forma de gránulos de polifosfato. Debido a que la primera descripción se realizó en *Spirillum volutans*, y al cambio característico de color (metacromasia) que determinan en algunos colorantes (azul de metileno, azul de toluidina) se les llama también gránulos de "volutina" o "metacromáticos". Los gránulos están constituidos en su mayor parte por **polifosfatos de cadena larga** del tipo de la sal de Graham; los metafosfatos circulares que se detectan frecuentemente en los análisis son aparentemente artefactos de degradación.



$$HO-\overset{\overset{O}{\|}}{\underset{\underset{OH}{|}}{P}}-O-\left[\overset{\overset{O}{\|}}{\underset{\underset{OH}{|}}{P}}-O\right]_n-\overset{\overset{O}{\|}}{\underset{\underset{OH}{|}}{P}}-OH$$

polifosfato



trimetafosfato

Los gránulos de volutina tienen función de almacén de fosfato, a costa del cual la célula todavía puede dividirse algunas veces incluso con deficiencias en fosfato. La "riqueza energética" de los polifosfatos es de importancia inferior.

Azufre. Muchas bacterias que oxidan sulfuro a sulfato almacenan transitoriamente azufres en forma de esferas muy refringentes. Tanto el azufre almacenado intracelularmente como el excretado por la célula está en forma líquida y pasa paulatinamente a la forma ortorrómbica. La cantidad de azufre almacenado depende del contenido del medio en el que se encuentra la bacteria de sulfuro de hidrógeno; en ausencia de sulfuro de hidrógeno el azufre se oxida a sulfato. El azufre es utilizado por las bacterias oxidadoras del ácido sulfhídrico (*Beggiatoa*, *Thiothrix*, *Achromatium*, *Thiovulum*; Fig. 2.46) como fuente energética, y por las bacterias rojas del azufre, fotosintéticas y anaeróbicas (*Chromatium*) como dador de hidrógenos. Las inclusiones de azufre que contienen a veces las cianobacterias y *Sphaerotilus natans* deben considerarse como productos de desintoxicación del sulfuro de hidrógeno, frecuente en los hábitats de estos organismos.

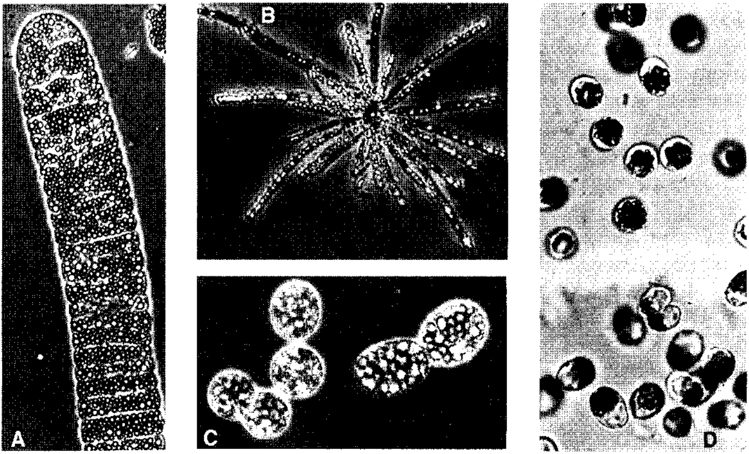


Fig. 2.46 Fotografías de bacterias incoloras que oxidan el ácido sulfhídrico. **A** *Beggiatoa gigantea* con inclusiones de azufre; fotografía al microscopio óptico, 300 aumentos; **B** Roseta de *Thiothrix*; fotografía al microscopio de contraste de fases, 300 aumentos; **C** *Achromatium oxaliferum* con inclusiones de carbonato cálcico y de azufre, 200 aumentos; **D** *Thiovulum* con inclusiones de azufre, 1000 aumentos. Fotografías de K. Schmidt (A, C), D. Claus (B), J.W.M. La Rivière y H. Schuur (D).

Otras inclusiones celulares. En *Bacillus thuringiensis* y especies relacionadas (*B. laterosporus, B. medusa*) se encuentran cuerpos de inclusión cristalinos junto a las esporas (Fig. 3.9). Estos cristales parasporales están constituidos por una protoxina. Esta proteína se disuelve en el jugo digestivo de insectos sensibles (fases de oruga de mariposas). La toxina liberada destruye el epitelio intestinal y conduce a la muerte de la oruga. Los preparados de bacilos son tóxicos sólo para unos pocos grupos de insectos y se utilizan ya con éxito en la lucha biológica contra parásitos.

Vacuolas de gas. Muchas bacterias acuáticas, sobre todo las fototrofas, pero también algunas incoloras (*Pelonema, Peloploca*), halobacterias (*Halobacterium halobium*) y algunos clostridios disponen de vacuolas de gas. Otorgan a las células la posibilidad de modificar su peso específico y flotar en el agua. A esta capacidad de flotación por vacuolas gaseosas hay que atribuir que algunas bacterias puedan mantenerse en una capa determinada de agua en lagos estratificados, en la que encuentran condiciones óptimas de crecimiento sin necesidad de un movimiento activo mediante flagelos. Las bacterias anoxigénicas fototrofas, entre ellas las bacterias rojas (*Lamprocystis, Amoebobacter, Thiodictyon*) y las bacterias verdes (*Pelodictyon*) crecen en la zona anaeróbica (en el hypolimnion) justo por debajo de la termoclina (Fig 17.2). Su capacidad de flotación es aparentemente suficiente para mantenerse en la capa de agua fría (pesada) del hypolimnion, pero no da el empuje necesario para pasar por encima de la termoclina a la capa de agua más cálida (ligera). Las cianobacterias fototróficas oxigénicas (*Oscillatoria agardhii, Aphanizomenon flos-aquae, Microcystis aeruginosa*) se desarrollan por encima de la termoclina. La flotación está regulada aparentemente por la fotosíntesis, la turgencia de las células, y el tamaño y número de las vesículas de gas.

Cada vacuola de gas está formada por varias o muchas vesículas de gas. Las vesículas tienen forma de huso (cilíndrica con extremos cónicos). Su pared no es una membrana estándar, sino que está formada sólo por proteína con estructura de hoja plegada. La pared sólo tiene 2 nm de grosor. La imagen permite reconocer unas cuadernas, orientadas en las vesículas cilíndricas como los cercos de un tonel. La pared tiene subunidades, moléculas proteicas con un peso molecular relativo de $14 \cdot 10^3$. Las moléculas proteicas parecen estar ordenadas de forma que la cara interna de la vesícula es hidrófoba y la externa hidrófila. Las vesículas de gas se encuentran en la célula paralelas unas a otras. Al microscopio óptico estas reuniones de vesículas de gas, esto es las vacuolas de gas, aparecen como espacios ópticamente vacíos y muy refringentes.

Gránulos de cianoficina. Las cianobacterias son los únicos procariotas que tienen reservas de nitrógeno combinado. Tienen gránulos de cianoficina. Están formados por un polipéptido especial (pág. 139).

Carboxisomas. En algunas bacterias autótrofas se encuentran carboxisomas. Son estructuras poliédricas del tamaño de cabezas de fagos, que además de algo de DNA contienen al enzima *ribulosa-bifosfato-carboxilasa.* Hay carboxisomas en *Nitrosomonas*, *Thiobacillus* y muchas cianobacterias.

2.2.8 Endósporas y formas de persistencia

Sólo un pequeño grupo de bacterias es capaz de formar endósporas. La enorme importancia de las endósporas se basa en su resistencia al calor. Mientras que calentando a 80°C durante 10 min (pasteurización) mueren todas las demás bacterias y también las células vegetativas de los formadores de esporas, las **endósporas termorresistentes** soportan un calentamiento considerablemente superior; algunas esporas soportan incluso la cocción durante horas. La laboriosa y costosa técnica de esterilización tiene como fin la eliminación de las endósporas. La termorresistencia de las esporas ofrece por otra parte la posibilidad singular del enriquecimiento selectivo de esporulados; se calienta tierra o material de otro hábitat 10 min a 80°C o 100°C, con lo que mueren todas las células vegetativas; sólo permanecen viables las esporas termorresistentes, que germinan en una incubación posterior sobre el medio de cultivo adecuado.

Clasificación de las bacterias formadoras de endósporas. Con una sola excepción las bacterias formadoras de endósporas son bacterias bacilares Gram positivas. La mayoría son móviles mediante flagelos de inserción peritrica. Los pertenecientes al género *Bacillus* son aeróbicos estrictos o facultativos. En los géneros *Clostridium* y *Desulfotomaculum* se reúnen los formadores de esporas anaeróbicos. El sistema de obtención de energía de los clostridios es exclusivamente fermentativo; *Desulfotomaculum* puede obtener energía por respiración anaeróbica con sulfato como aceptor de electrones. *Sporolactobacillus* pertenece a las bacterias del ácido láctico. *Sporosarcina* tiene células esféricas, pero por sus características fisiológicas pertenece al género *Bacillus*. El contenido en GC de los formadores de esporas es sorprendentemente bajo; los clostridios, con un contenido en GC del 22 al 27% se encuentran en el extremo inferior de la lista de los contenidos en GC de los procariotas.

Reconocimiento de las endósporas. Al microscopista las esporas le llaman la atención por su elevado índice de refracción; corresponde al de una proteína deshidratada, e indica que en la espora hay una gran cantidad de material rico en proteína concentrado en un pequeño espacio. La espora contiene casi toda la materia seca de la célula materna, pero tiene tan sólo un décimo de su volumen. En casos de duda puede determinarse por **tinción de esporas** si de hecho existe una verdadera endóspora. Si se hierve un frotis bacteriano fijado al calor en carbolfucsina, las esporas toman el colorante, y no lo ceden ni siquiera con etanol o ácido acético 1 molar, mientras que se decolora el resto del espacio celular.

Esporulación. Las esporas se forman en el interior de la bacteria. La esporulación se inicia con una concentración de material proteico; aumenta el índice de refracción de la zona de la espora; utilizando las sustancias de reserva presentes (ácido poli-β-hidroxibutírico en los aeróbicos, o polisacáridos en los anaeróbicos) tienen lugar numerosas transformaciones de sustancias. Durante las primeras cinco horas de la esporulación se degrada gran parte de las proteínas de la célula materna. Como sustancia específica de la espora se forma ácido dipicolínico (piridín-2,6-dicarbónico). En las células vegetativas no se presenta este ácido. Durante la síntesis del ácido se captan preferentemente iones calcio; en las esporas maduras el ácido está en forma de quelato cálcico, y puede representar de un 10 a un 15% del peso seco. El ácido dipicolínico se localiza en el protoplasto de la espora, y sólo en endósporas termorresistentes (Fig. 2.47 y 2.48).

La esporulación es uno de los procesos más complejos de diferenciación de la célula bacteriana. Se inicia con una **división celular especial y desigual** (Fig. 2.47). Por estrangulamiento de la membrana citoplasmática se separa una parte del protoplasto de la célula materna. Este protoplasto de la espora contiene una parte del material nuclear, esto es, un genoma. En este caso no se produce, como en el caso de la división celular normal, la formación de una pared celular entre los dos protoplastos; el protoplasto de la espora es rodeado por la membrana citoplasmática de la célula materna y es englobado. El resultado es que el protoplasto de la espora está rodeado por dos membranas citoplasmáticas; las dos están implicadas en la síntesis de la pared de la espora. La membrana del protoplasto de la

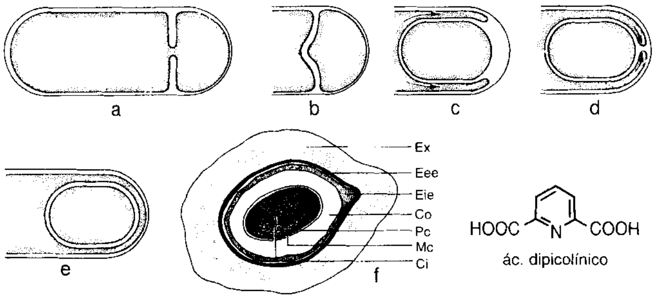


Fig. 2.47 Esquema de la esporulación y de la constitución de las esporas maduras. a-b formación del septo; c-e formación de la prespora; f espora madura. Ci = citoplasma, Mc = membrana citoplasmática, Pc = pared celular de la célula germinativa, Co = córtex de la espora, Eie = envuelta interna de la espora, Eee = envuelta externa de la espora, Ex = exosporio (según W.G. MURREL).

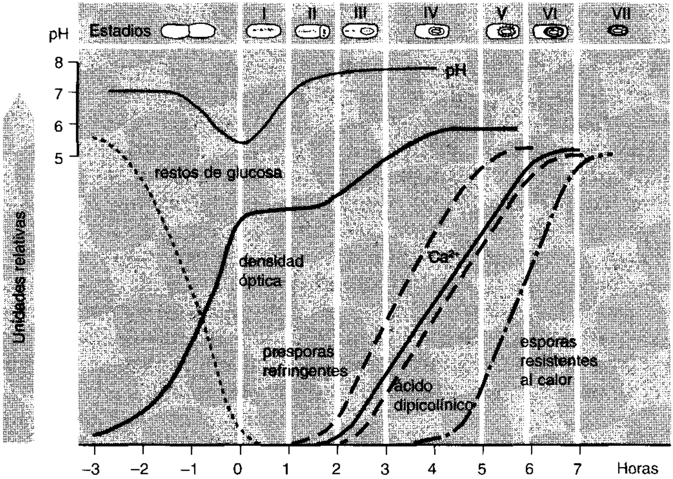


Fig. 2.48 Cambios morfológicos y fisiológicos durante la esporulación de bacterias esporógenas aeróbicas. El proceso se desencadena cuando se ha consumido la glucosa (tiempo cero). La formación de las esporas puede seguirse por el incremento en el contenido en calcio o en ácido dipicolínico, así como por el aumento en el número de esporas resistentes a la temperatura y en la refringencia. Los cambios bioquímicos son paralelos a los morfológicos; los estadios I a VII se representan esquemáticamente en la parte superior.

espora sintetiza hacia el exterior la pared celular germinal; la membrana procedente de la célula madre sintetiza hacia el interior la corteza de la espora (córtex). Está compuesto por una capa gruesa de glucopéptido, que es parecido a la mureína de la pared celular de las células vegetativas, diferenciándose, entre otras cosas, por el grado de enlaces transversales. La cubierta externa de la espora está formada por la célula materna; se compone fundamentalmente de polipéptidos. La célula materna forma también una fina envuelta polipeptídica, el exosporio; sólo se da en pocas bacterias (p. ej. *Bacillus cereus*), y rodea a la espora como una envuelta suelta en forma de globo. Atendiendo a esta doble formación de capas envolventes resulta comprensible que las envueltas representen aproximadamente el 50% del volumen o del peso seco de la espora madura.

Inducción de la esporulación. Las esporas no representan en absoluto un estadio obligado en el ciclo biológico de los bacilos; bajo condiciones de nutrición favorables, los bacilos también se reproducen durante un tiempo ilimitado como células vegetativas. La formación de las esporas no se desencadena hasta que faltan nutrientes o cuando se acumulan productos metabólicos; sólo se forman cuando lo permiten las condiciones generales; la desecación no provoca la esporulación. Si se trasladan células vegetativas a agua destilada tiene lugar una "esporulación endotrófica", esto es, una formación de esporas a costa de las sustancias de reserva almacenadas intracelularmente. Aparentemente la esporulación se desencadena por falta de un sustrato externo. La inducción de la esporulación se manifiesta a lo largo de varias horas. Si, por ejemplo, a una suspensión de células vegetativas de *Bacillus cereus* var. *mycoides* se le añade glucosa durante las cinco primeras horas siguientes a haberlos transferido a agua, no se realiza la esporulación: el sustrato añadido reprime la esporulación. Si la adición de glucosa tiene lugar después de más de seis horas, es menos eficaz, no se da la represión; la inducción (desrepresión) se mantiene, y entre las horas décima y decimotercera después de la transferencia a agua habrá esporulado aproximadamente el 90% de las células. Según esto, la esporulación está regulada por factores ambientales.

El número de células esporuladas se incrementa en muchos casos cuando se añaden al medio sales de manganeso.

Por otra parte, la capacidad de formar endósporas se pierde paulatinamente cuando se resiembran frecuentemente células vegetativas. Como las suspensiones de los formadores de esporas contienen por lo general tanto esporas como células vegetativas, se acostumbran a calentar brevemente antes de resembrarlas. Esta medida ayuda al mantenimiento o incremento de la capacidad de formar esporas.

Características de las esporas maduras. Las esporas se liberan por autolisis de las células maternas. Las esporas maduras no presentan ninguna actividad metabólica. Disponen de un elevado grado de resistencia frente a la acción del calor, radiaciones y productos químicos. La resistencia frente al calor se atribuye al contenido hídrico extremamente bajo. Las esporas de *Bacillus megaterium* contienen aproximadamente un 15% de agua, algo así como la lana o la caseína seca. Las células bacterianas vegetativas liofilizadas son también muy resistentes al calor. Además, la termorresistencia de las esporas es casi proporcional al contenido en ácido dipicolínico.

La resistencia frente a las radiaciones es superior en las esporas que en las células vegetativas. Es más o menos proporcional al contenido en puentes disulfuro de las capas proteicas externas. La envuelta de la espora contiene fundamentalmente una proteína rica en cisteína, semejante a la queratina. La resistencia química de las endósporas hay que atribuirla a la impermeabilidad de la cubierta de la espora frente a muchos productos químicos.

Germinación de las esporas. En medios de cultivo apropiados germinan la mayoría de las esporas. Mediante un tratamiento previo adecuado, almacenamiento y por calentamiento se eleva el número (porcentaje) de esporas que germinan. Para *Bacillus subtilis* se considera como tratamiento óptimo para la esporulación un período de reposo de siete días, y un calentamiento en agua a 60°C durante 5 minutos. Otras esporas pueden activarse por una ebullición breve (10 min a 100°C). El tratamiento por shock térmico ha de ser inmediatamente anterior a la siembra de las esporas, ya que el proceso de activación es reversible. La germinación de las esporas va precedida de una captación de agua y de una hidratación. La germinación de las esporas activadas requiere en algunos casos la presencia de glucosa, aminoácidos, nucleósidos y otras sustancias. Durante la germinación se suceden profundas modificaciones fisiológicas: aumentan rápidamente la respiración y las actividades enzimáticas; se excretan aminoácidos, ácido dipicolínico y péptidos; la pérdida de peso seco de las esporas durante la germinación supone del 25 al 30%. Durante la germinación las esporas pierden la resistencia térmica. El tubo germinativo que surge de la espora parece estar rodeado por una pared celular incompleta, muy delgada, de forma que los protoplastos incluso pueden captar DNA (véase Transformación). La aparición del tubo germinativo puede ser polar o lateral, rasgándose o perforándose las cubiertas de la espora (Fig. 2.49).

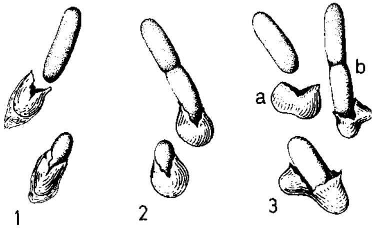


Fig. 2.49 Esporas en germinación. **1** Germinación polar de una espora de *Clostridium* (con exosporio); **2** germinación polar de una espora de *Bacillus megaterium*; la cubierta de la espora ha quedado pegada; **3** germinación lateral de esporas de *Bacillus*, **3a** *B. cereus*, **3b** *B. subtilis*.

Duración de la vida de las esporas. En forma de esporas las bacterias pueden permanecer durante largos lapsos de tiempo en estado de vida latente. En la tierra adherida a las plantas del herbario del Jardín de Kew (Inglaterra), almacenadas secas durante 200 a 320 años, sólo pudieron demostrarse unas pocas esporas viables de *Bacillus subtilis* y *B. licheniformis*. En muestras de hace 50 a 100 años se encontraron además *B. coagulans* y *B. circulans*. Al valorar experimentos de este tipo se vio que en 50 años perdían la viabilidad el 90% de las esporas almacenadas en tierra seca. Según esto, una tonelada de tierra seca todavía tendría algunas esporas viables después de 1000 años.

En estado de sequedad se mantiene durante años la viabilidad de muchas bacterias, sino todas sí la mayoría. Para **conservar las bacterias** en colecciones por lo general se secan células vegetativas congeladas (liofilización) y se guardan a temperatura ambiente, o a temperaturas inferiores bajo vacío. Tal como ya calculó BEQUEREL, los microorganismos pueden mantenerse durante millones de años a temperaturas próximas al cero absoluto; experimentos a corto plazo con nitrógeno líquido, y su extrapolación, parecen confirmar esta suposición. Las bacterias sensibles a la liofilización pueden mantenerse en suspensiones durante años a la temperatura del nitrógeno líquido.

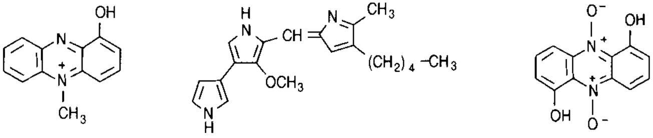
Otras formas de perdurabilidad (cistos, exósporas, mixósporas). Las endósporas son las formas de perdurabilidad de las bacterias más resistentes frente al calor, la desecación, la radiación y las influencias químicas. Además de las endósporas se encuentran en algunas otras pocas bacterias diferentes células de perdurabilidad: las exósporas y los cistos. La formación de exósporas sólo se ha visto hasta ahora en la bacteria oxidadora del metano *Methylosinus trichosporium*; las exósporas surgen por gemación de la célula materna, y tienen las características de las endósporas de *Bacillus*. Algunas bacterias forman células esferoidales de pared gruesa, que se llaman cistos. En la formación de los cistos al agotarse los nutrientes, se transforma la célula vegetativa bacilar entera en un cisto, y no sólo una parte de la célula, como en la formación de las endósporas. Los cistos de las especies del género *Azotobacter* y *Methylocystis* son resistentes frente a la desecación, al tratamiento mecánico y a las radiaciones, pero no frente al tratamiento térmico. Una transformación semejante se da también en la formación de mixósporas a partir de las células vegetativas bacilares de los géneros *Myxococcus* y *Sporocytophaga*.

Las células del género *Arthrobacter* (*A. globiformis*) son pleomórficas. Cuando disponen de abundante sustrato crecen en forma de bacilos; cuando se agota el sustrato aparecen células cocoidales. *Arthrobacter* pertenece a las bacterias que resisten la desecación del suelo en estado de reposo durante un cierto tiempo; no se conoce ninguna diferenciación estructural.

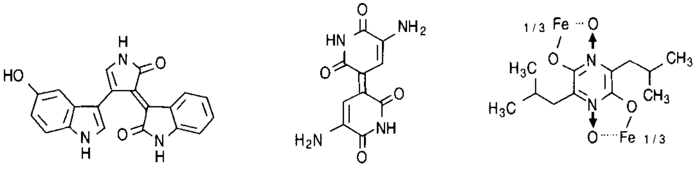
2.2.9 Pigmentos de las bacterias y los hongos

Muchas colonias bacterianas y de hongos llaman la atención por su coloración característica, bien debido a una excreción de un colorante al medio, o bien por la pigmentación de las células. La capacidad de sintetizar sustancias coloreadas está determinada genéticamente y es por tanto característica. Las formas coloreadas se reconocen e identifican fácilmente. Los pigmentos son derivados de distintas clases de sustancias: carotenoides, pirroles, azaquinonas, antocianos, etc. (Fig. 2.50).

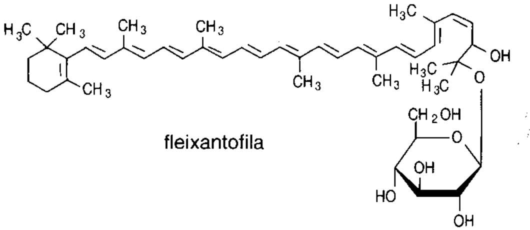
Efecto protector frente a la luz y la radiación UV. En las placas de Petri que contienen agar nutritivo complejo y que están expuestas durante un cierto tiempo a aire con polvo, aparecen frecuentemente colonias coloreadas. Predominan los tonos amarillos, naranja y rojo debidos a **carotenoi-**



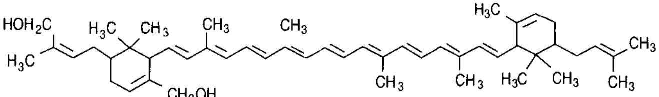
piocianina prodigiosina iodinina



violaceína indigoidina pulquerrimina



fleixantofila



sarcinaxantina

Fig. 2.50 Algunos pigmentos formados por bacterias y levaduras. La piocianina es segregada por *Pseudomonas aeruginosa* y la iodinina por *Chromobacterium iodinum*; la indigoidina la producen diversas bacterias, entre ellas *Pseudomonas indigofera*; la prodigiosina es el pigmento de *Serratia marcescens* (llamada anteriormente *Bacterium prodigiosum*); la violaceína la forma *Chromobacterium violaceum*; la pulquerrimina es el pigmento de la levadura *Candida pulcherrima*; la fleixantofila es el principal carotenoide de *Mycobacterium phlei* y está en forma de compuesto glucosídico; la sarcinaxantina es el carotenoide principal de las especies amarillas de *Sarcina* (*Micrococcus luteus*).

des. Entre las bacterias se trata preferentemente de representantes de los géneros *Micrococcus*, *Corynebacterium*, *Mycobacterium* y *Nocardia*, y de la levadura *Rhodotorula*. El que entre los "gérmenes aéreos" sean muy frecuentes las formas pigmentadas se debe a que los pigmentos ejercen un efecto protector frente a las radiaciones de la luz visible y del ultravioleta próximo. Por ello, en los hábitats sometidos a la luz (polvo, paja) las bacterias incoloras mueren más rápidamente que las pigmentadas. El efecto protector frente a las lesiones fotodinámicas pudo demostrarse también en una bacteria halófila, de color naranja, que contiene carotenoides, y en su mutante incolora. Mientras que con iluminación tenue crecen igualmente bien los dos tipos, el crecimiento del mutante incoloro quedaba inhibido por la intensa luz solar, pero no afectaba a la de tipo silvestre pigmentado. La muerte por la luz visible sólo tiene lugar en presencia del oxígeno atmosférico, y se basa en una **fotooxidación**: al parecer algunos pigmentos celulares (flavinas y citocromos) actúan como catalizadores (fotosensibilizadores) durante este proceso. Los carotenoides se localizan en la membrana citoplasmática y protegen a las regiones sensibles de la célula frente a la fotooxidación.

Fotosensibilización. La sensibilidad normal frente al oxígeno puede verse incrementada por la luz visible. Si se tiñen bacterias con colorantes vitales, p. ej. azul de metileno, eosina, o anaranjado de acridina, y luego se someten a la luz, se ve que mueren más rápidamente que las no coloreadas. La molécula del colorante absorbe la luz y puede ceder su energía a una molécula de O_2. La molécula de O_2 que se encontraba en su estado normal (triplete) pasa entonces a un estado excitado (singulete). Este singulete de oxígeno determina entonces reacciones de oxidación, que no es capaz de desencadenar el O_2 normal (cicloadiciones, "reacciones en"). Se utiliza esta muerte por fotosensibilización de bacterias posiblemente patógenas en granjas de animales de los que se aprovecha su piel, y en parques zoológicos, añadiendo colorantes al agua de bebida. Las bacterias fotosensibilizadas mueren ya por acción de la luz natural diurna.

Formación de carotenoides. Los carotenoides rojos (con 12 a 13 enlaces dobles y con grupos metoxi u oxo) dan a las bacterias rojas fotosintéticas su color rojo intenso. Los pigmentos no sólo tienen aquí una acción protectora, sino que también absorben la luz con fines fotosintéticos y están implicados en la fototaxis durante la recepción de la luz. Los carotenoides se localizan junto a las bacterioclorofilas en las membranas fotosintéticamente activas (tilacoides, cromatóforos).

En muchos microorganismos que contienen pigmentos su formación –al igual que los pigmentos fotosintéticamente activos en las plantas superiores– es dependiente de la luz. Las micobacterias, entre ellas también las patógenas de la tuberculosis (*Mycobacterium tuberculosis*) sólo forman carotenoides cuando las células están expuestas a la luz. Esto también es válido para bacterias que crecen en el jamón o en el queso. La pigmentación depende en muchos casos también de la composición del sustrato y de las temperaturas de incubación.

Pulquerrimina. La coloración de levaduras rojas (*Rhodotorula*, *Sporobolomyces salmonicolor*) se debe mayoritariamente a los carotenoides. A otra clase distinta de sustancias pertenece la pulquerrimina, sintetizada por *Candida pulcherrima*. Esta levadura puede aislarse junto con *Candida reukaufii* a partir de flores con néctar, de zumos de frutas y del tracto intestinal de las abejas. En medios de cultivo que contengan hierro forma colonias de color rojo oscuro. El colorante rojo, piracina, es insoluble en agua y en disolventes, contiene hierro acomplejado.

Prodigiosina. En medios de cultivo que contengan hidratos de carbono se desarrolla con frecuencia el que anteriormente se llamaba "hongo de las hostias" o *Bacterium prodigiosum*, y que actualmente se denomina *Serratia marcescens*. La coloración rojo oscura de las colonias y de sus suspensiones se debe a la presencia de prodigiosina, un pigmento cuya estructura básica contiene tres anillos pirrólicos. Este pigmento también se encuentra en actinomicetos.

Indigoidina. La indigoidina pertenece a la clase de compuestos de las azaquinonas (diazadifenoquinonas). Se trata de un pigmento azul que se excreta al exterior de la célula por diversas bacterias, *Pseudomonas indigofera*, *Corynebacterium insidiosum*, *Arthrobacter atrocyaneus* y *Arthrobacter polychromogenes*.

Violaceína. *Chromobacterium violaceum* puede aislarse regularmente del suelo colocando granos de arroz en una placa con suelo muy mojado; las colonias se reconocen por su coloración azul violeta, debido al pigmento purpúreo violaceína, insoluble en agua. Por su estructura química, se trata de un derivado del indol, formado por oxidación del triptófano.

Colorantes fenacínicos. Muchos pigmentos de los que son excretados al medio de cultivo por bacterias acuáticas pertenecen a las fenacinas. Entre ellas se encuentra el derivado de la fenacina más conocido, la piocianina; lo forman *Pseudomonas aeruginosa* (antes *P. pyocyanea*). Diversas cepas de *Pseudomonas* excretan además, o aisladamente, fenacina-1-carbónico, oxiclororafina e iodinina.

Pigmentos amarillo verdosos fluorescentes. Los vistosos pigmentos de fluorescencia amarillo verdosa bajo las lámparas ultravioletas o de tubos fluorescentes producidos por los pseudomonas tienen la función de **sideróforos**. Se sintetizan y se liberan al medio de cultivo cuando hay una deficiencia (limitación) de sales de hierro. Sirven para la captación y el transporte de hierro al interior de la célula (pág. 289). Los sideróforos fluorescentes de *Pseudomonas putida* y *P. aeruginosa* son pioverdinas (= pseudobactina). Son cromopéptidos compuestos por una cadena peptídica de 6 a 10 aminoácidos junto con un cromóforo, una diamino-dihidroxiquinolina.

Metabolitos secundarios. Los pigmentos de los microorganismos son metabolitos secundarios (pág. 375), esto es, no pertenecen a aquellos compuestos presentes en todos los organismos. Ya en su estructura se reconoce que derivan de los metabolitos normales o constituyentes celulares. Algunos pigmentos tienen propiedades antibióticas y muchos microorganismos pigmentados son productores de antibióticos. La correlación entre pigmentación y formación de metabolitos secundarios es tan estrecha, que en muchos de los formadores de pigmentos puede suponerse con elevada probabilidad que sintetizan también antibióticos y otras sustancias activas.

3. Los grupos de procariotas

3.1 Introducción

En base a las características citadas, entre ellas la pared celular de mureína, la región nuclear sin membrana y la escasa compartimentación, se pueden reunir como **Procariotas** a los grupos **esquizomicetos** (bacterias en sentido amplio) y **esquizofíceas** (o cianobacterias), consideradas ya anteriormente como **esquizófitos**. El **código bacteriológico** es el responsable de la descripción y nomenclatura de los procariotas. Ha sido elaborado por el Comité Internacional de Bacteriología Sistemática (International Committee of Systematic Bacteriology) y también controla su cumplimiento. El código bacteriológico se diferencia esencialmente del botánico por la regla de que cada nueva descripción de una cepa debe ir acompañada del depósito de un cultivo viable como cepa de referencia o cepa tipo en una colección de microorganismos reconocida.

Descripción de las bacterias. A la descripción de las bacterias pertenece la indicación de sus **características morfológicas**, esto es, si se trata de un coco, un bacilo, o un espirilo, si presenta cápsulas, si las células están aisladas u ordenadas en grupos (filamentos, tétradas, paquetes), si disponen de flagelos y cómo se insertan, si forman endósporas, y si las células se tiñen con la tinción de Gram. La descripción se completa citando las **características metabólico-fisiológicas** más importates. Hay que indicar: 1. las relaciones respecto al oxígeno, esto es, si las células pueden crecer bajo condiciones aeróbicas, anaeróbicas o ambas; 2. si la obtención de energía se realiza por respiración, fermentación o por fotosíntesis; 3. la dependencia del crecimiento frente al pH, con valores óptimos y límites de tolerancia; 4. nutrientes utilizables; 5. hábitat; 6. relaciones simbióticas o parasitarias; 7. inclusiones celulares, pigmentación y sustancias capsulares; 8. composición de los componentes de la pared celular (estructura del glucopéptido, liposacáridos, ácidos teicoicos); 9. diferenciación serológica (antígenos de superficie, proteínas homólogas); 10. composición de bases del DNA (mol % de GC); 11. hibridaciones DNA-DNA, posibilidad de transformación en transferencias interespecíficas; 12. secuencia del RNAr 16S o del 5S; 13. sensibilidad frente a los antibióticos.

Nomenclatura. Para las bacterias también es válida la **nomenclatura binaria** conocida para animales y plantas: un nombre de género y otro de especie. En la época de los grandes descubrimientos ha sido necesario desviarse de la regla inicial, consistente en expresar en el nombre genérico las características morfológicas y en el específico las fisiológicas. Arrollados por el gran número de tipos fisiológicos, BEIJERINCK y WINOGRADSKY dieron nombres de géneros que hicieran referencia a la ecología, fisiología y bioquímica. Así, se definieron géneros desde puntos de vista fisiológicos (*Acetobacter*, *Nitrosomonas*, *Azotobacter*), según la pigmentación (*Chromobacterium*, *Rhodomicrobium*), según enfermedades (*Pneumococcus*, *Phytomonas*) y según nutrientes (*Haemophilus*, *Amilobacter*). Siguiendo las reglas de la nomenclatura, se mantiene el nombre dado en la primera descripción con garantías. La adjudicación y la utilización de los nombres están regidas por unas leyes fijas.

Clasificación. La clasificación de los microorganismos procariotas sigue en primer lugar propósitos prácticos y se utiliza para el reconocimiento de las formas descritas. Por clasificación se entiende la ordenación de unidades en grupos de unidades superiores. Se realiza a varios niveles. La unidad básica, el cultivo puro de una bacteria aislada es la "cepa" o "estirpe". Las cepas se reúnen en especies (*species*), éstas últimas en géneros (*genus*, plur. *genera*), y éstos se agrupan de nuevo en familias (sufijo: *-aceae*). La clasificación requiere una descripción adecuada de las cepas y se completa con la comparación de las unidades y su delimitación. La **taxonomía** se ocupa de la creación de sistemas de ordenación.

Se distinguen dos clases de clasificaciones: las filogenéticas o "naturales" por una parte, y las artificiales por otra. El objetivo último de la taxonomía bacteriana es la ordenación de las formas relacionadas (esto es, las emparentadas por antecesores comunes), y el desarrollo de un **árbol genealógico filogenético de las bacterias**. No hay ninguna duda de que esta meta se alcanzará algún día mediante las características químicas, como por ejemplo la secuencia de los aminoácidos en proteínas enzimáticas con la misma función, o la secuencia de las bases nucleotídicas en componentes celulares conservados, como son los ácidos nucleicos ribosómicos.

Clasificación artificial. La clasificación "artificial" no es tan exigente como la filogenética. Para ella basta con ordenar los organismos por sus semejanzas y se utiliza para la **identificación o reconocimiento (determinación) de los organismos**. Un sistema artificial se orienta en primer lugar para ser utilizado como una clave de identificación. La obra más completa en la que se describen bacterias es el "BERGEY'S Manual of Determinative Bacteriology", que en 1974 apareció en su octava edición. Contiene nombres, descripciones morfológicas y fisiológicas de las características, indicaciones bibliográficas, así como claves para la identificación de las bacterias de nuevo aislamiento. Se está preparando una nueva edición de las claves de identificación del "BERGEY'S".

Taxonomía numérica. La "taxonomía numérica" ha dado el paso siguiente para una ordenación más objetiva. En primer lugar, hizo suyos los principios de ADANSON, según los cuales en la clasificación todas las características determinables deben tener el mismo peso. Para la valoración numérica se establecen tantas características como sea posible, y hay que considerarlas de forma que puedan expresarse de una forma alternativa (+ o –). La valoración de las combinaciones de características debe realizarse con ordenadores. Para ello se compara cada carácter de cada cepa con cada carácter de todas las cepas. La semejanza entre las cepas investigadas es tanto mayor cuanto mayor es la relación entre las características concordantes con respecto al total de las características consideradas. Para la comparación por parejas se utiliza el coeficiente de semejanza (coeficiente S). Se define como

$$S = \frac{(a + d)}{(a + b + c + d)}$$

Se indica como a y d la suma de características en las que coinciden la cepa A con la cepa B (a: ambos positivos; d: ambos negativos), b es la suma de características positivas en A y negativas en B y, finalmente, c es la suma de características en las que A es negativo y B positivo. En los cálculos se obtiene valores entre 1,0 y cero. $S = 1$ indica 100% de semejanza, esto es, identidad, y un valor de $S < 0,02$ una diferencia total. Los valores obtenidos se representan en matrices de similitud y pueden presentarse en forma de dendrograma (de forma similar a como se haría un árbol filogenético). La taxonomía numérica, no obstante, no tiene ninguna relación con la filogenia.

Filogenia bacteriana. C. WOESE pudo desarrollar un **árbol filogenético de los procariotas** mediante el análisis y comparación de características altamente conservadas. Los ribosomas son los lugares de la síntesis proteica y se encuentran por tanto en todas las células. Desde el punto de vista de su función son muy conservativos. Esto es especialmente válido para los RNA ribosómicos (RNAr) ya que su secuencia de bases no está influida por la degeneración del código genético ni por mutaciones supresoras. El RNAr cumple por tanto las condiciones que debe tener un marcador filogenético general. Para ello se han aislado los **RNAr 16S** de las subunidades menores de los ribosomas de los organismos que se quieren comparar. Para el análisis se rompe con enzimas específicos el RNA en grandes fragmentos, los oligonucleótidos. Éstos se separan por electroforesis y se determina la **secuencia de bases de los oligonucleótidos**. Si se establece en un catálogo la secuencia de bases que son características para cada organismo y se comparan las secuencias con ayuda de un programa de ordenador, se reconocen, por una parte, secuencias conservadas, que son muy parecidas entre todas las bacterias. No obstante, se diferencian significativamente de las secuencias correspondientes de los eucariotas y de las de otro gran grupo bacteriano diferente. En otros oligonucleótidos las secuencias se diferencian ya entre géneros y entre especies. Así se han podido establecer las llamadas "secuencias firma" (signature sequences) que son características de grupos de organismos. Esta valoración ha conducido a la formación de dendrogramas, que deben considerarse como partes de un árbol filogenético. Así se establecen relaciones entre organismos que hasta ahora eran desconocidas.

Uno de los primeros resultados apasionantes de la secuenciación del RNAr 16S fue el descubrimiento de que entre dos bacterias morfológica y fisiológicamente tan distantes como *Escherichia coli* y una cianobacteria existen homologías en la secuencia muy superiores a las que se dan entre *E. coli* y un *Methanobacterium* de igual morfología. Así, *Methanobacterium* se manifestó como miembro de un gran grupo diferente de procariotas. Hay que aceptar que los procariotas se dividieron en una época muy temprana en dos grupos, las llamadas **arqueobacterias** y todas las demás bacterias, que se denominan **eubacterias**. Se acepta que a partir de una célula primitiva, el progenote, se han desarrollado por una parte las arqueobacterias y por otra las eubacterias. Como un tercer grupo aparecen los **eucariotas**. Por tanto, sus antecesores tienen que haberse desarrollado también a partir de una raíz común en épocas tempranas (Fig. 3.1).

La comparación de eubacterias representativas permite reconocer once grandes grupos (véase Fig. 3.2). Uno de ellos es el de las **bacterias rojas fototróficas anoxigénicas**. Un análisis fino de las bacterias pertenecientes a este grupo de Gram negativos con otras muchas bacterias quimiotrofas Gram negativas condujo igualmente a un resultado sorprendente: las bacterias rojas pueden ordenarse en cuatro grupos que se denominan **bacterias rojas alfa, beta, gamma y delta**. Cada uno de estos grupos contiene a algún representante bien conocido de las bacterias rojas (con la excepción del grupo delta) junto con un gran número de bacterias heterotróficas o quimioautótrofas, no fotosintéticas (véase Fig. 3.3). Desde el punto de vista de la filogenia esto significa que a lo largo de la evolución se han desarrollado por lo menos cuatro grupos de bacterias rojas. A partir de los representantes que forman cada una de estas ramas tienen que haberse desarrollado las bacterias heterotróficas respiratorias o fermentativas por especialización metabólica y pérdida del aparato fotosintético. A todas estas bacterias no fotosintéticas, relacionadas filogenéticamente con las bacterias rojas, se las agrupa bajo el nombre de **proteobacterias**. Ello conduce a la suposición general de que la mayoría de las bacterias de los suelos, las aguas y muchas bacterias patógenas proceden del grupo de las bacterias rojas.

Resulta comprensible que el sistema taxonómico basado en caracteres fenotípicos –como forma, flagelación, comportamiento frente al Gram– se diferencie mucho del sistema filogenético. Únicamente algunos grupos que desde el punto de vista de la taxonomía clásica pertenecen a familias

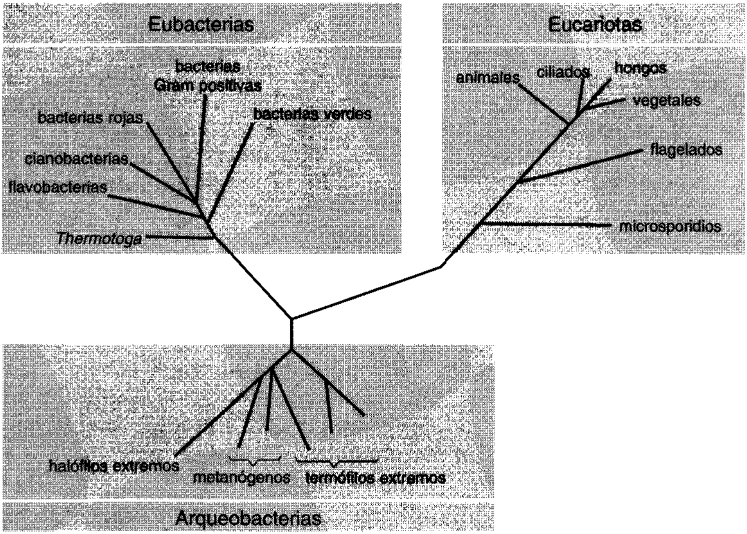

Eubacterias
bacterias Gram positivas
bacterias rojas
bacterias verdes
cianobacterias
flavobacterias
Thermotoga
Eucariotas
animales
ciliados
hongos
vegetales
flagelados
microsporidios
halófilos extremos
metanógenos
termófilos extremos
Arqueobacterias

Fig. 3.1 Árbol filogenético sin raíz, tal como resulta del análisis de la secuencia de bases del RNA ribosómico.

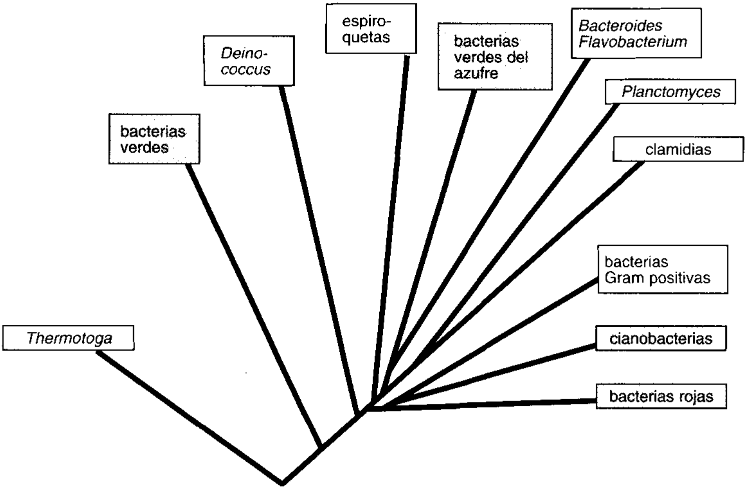

espiroquetas
Deinococcus
bacterias verdes del azufre
Bacteroides Flavobacterium
Planctomyces
bacterias verdes
clamidias
bacterias Gram positivas
Thermotoga
cianobacterias
bacterias rojas

Fig. 3.2 Árbol filogenético de las eubacterias, tal como resulta de la secuencia de bases del RNAr 16S.

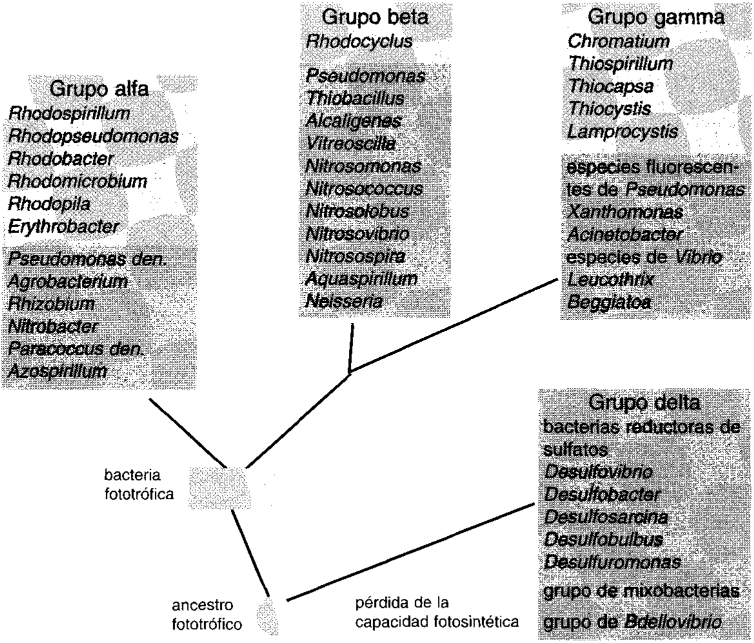

Grupo beta
Rhodocyclus
Pseudomonas
Thiobacillus
Alcaligenes
Vitreoscilla
Nitrosomonas
Nitrosococcus
Nitrosolobus
Nitrosovibrio
Nitrosospira
Aquaspirillum
Neisseria
Grupo gamma
Chromatium
Thiospirillum
Thiocapsa
Thiocystis
Lamprocystis
especies fluorescentes de Pseudomonas
Xanthomonas
Acinetobacter
especies de Vibrio
Leucothrix
Beggiatoa
Grupo alfa
Rhodospirillum
Rhodopseudomonas
Rhodobacter
Rhodomicrobium
Rhodopila
Erythrobacter
Pseudomonas den.
Agrobacterium
Rhizobium
Nitrobacter
Paracoccus den.
Azospirillum
bacteria fototrófica
Grupo delta
bacterias reductoras de sulfatos
Desulfovibrio
Desulfobacter
Desulfosarcina
Desulfobulbus
Desulfuromonas
grupo de mixobacterias
grupo de Bdellovibrio
ancestro fototrófico
pérdida de la capacidad fotosintética

Fig. 3.3 Árbol filogenético de las bacterias rojas, incluyendo a otras bacterias Gram negativas relacionadas (Proteobacterias). En rojo se indican las bacterias fototrofas; en gris las no fotosintéticas.

o unidades superiores, parecen estar también relacionados filogenéticamente. Éste es, por ejemplo, el caso de las bacterias reductoras de sulfatos (grupo delta) o de las Enterobacteriáceas. En contraposición, los pertenecientes a los pseudomonas se distribuyen en los grupos alfa, beta y gamma de las ramas filogenéticas de las bacterias rojas. Por tanto, el tipo celular conocido como *Pseudomonas* es el resultado de una evolución convergente.

Un sistema que esté basado en las relaciones de afinidad filogenéticas no invalida ni hace innecesario un sistema basado en la taxonomía tradicional para los procariotas. Este último tiene igual que antes un papel muy significativo en la **identificación** y en la **descripción** de las bacterias. A pesar de ello, el sistema filogenético proporciona un gran número de principios heurísticos, tanto para la investigación evolutiva como para la Microbiología aplicada.

Cuadro sinóptico de la diversidad de los procariotas. En la revisión dada en el presente capítulo pretendemos dar al principiante una visión de conjunto de la diversidad de los procariotas. El tratamiento se basa en el Manual de BERGEY de Bacteriología Determinativa, 8ª edición (1974), y en el manual de BERGEY de Bacteriología Sistemática (formado por cuatro tomos, 1984-1989). No obstante, debido a los nuevos descubrimientos que se están haciendo en el campo de la Microbiología se puede ya adelantar que pronto tendrá que completarse y habrá nuevas modificaciones. A pesar de ello quedan las características de las bacterias visibles al microscopio. También es relativamente fácil establecer la relación entre el crecimiento y el oxígeno, así como la coloración de Gram.

Por este motivo, para el tratamiento de los procariotas damos en primer lugar una lista de tres páginas de las eubacterias ordenadas según su morfología como cocos, bacilos y espirilos (bacilos curvados), según su capacidad para desarrollarse aeróbica o anaeróbicamente y según la tinción de Gram. Aquellas bacterias que no pueden ordenarse sin dificultad dentro de alguna de las tres morfologías básicas, se incluyen en la lista como "grandes grupos especiales".

A continuación, y bajo los apartados 3.2 hasta 3.20 se introducirán los grupos bacterianos siguiendo el orden dado en la lista. Algunos grupos se caracterizarán muy sucintamente y se hará referencia al capítulo correspondiente en la parte de fisiología de este texto, en el que los grupos bacterianos se presentan haciendo hincapié en los aspectos fisiológicos y bioquímicos. Con algo más de profundidad se describirán aquí tan sólo aquellos grupos bacterianos que en la parte fisiológica se tratan muy poco, o no se tratan en absoluto.

La visión de los grupos de procariotas indica ya el camino para la **identificación** de las bacterias. Todo biólogo tiene que haber hecho ya la experiencia de que con ayuda de las claves de identificación habituales únicamente puede identificar aquello que ya conocía previamente. La identificación de una bacteria presupone unos amplios conocimientos previos y cuando la identificación de un bacilo aislado del yogurt conduce al género *Methanobacterium*, ¡las dudas están justificadas!

3.2 Los grupos de los procariotas

La ordenación que presentamos a continuación sigue una división basada en las morfologías fáciles de determinar microscópicamente (cocos, bacilos, espirilos), la tinción de Gram y las relaciones frente al oxígeno (aeróbico, anaeróbico).

1. Cocos, bacterias esferoidales

A) Cocos Gram positivos

aeróbicos	*Micrococcus, Staphylococcus, Streptococcus, Leuconostoc, Pediococcus*
anaeróbicos	*Peptococcus, Peptostreptococcus, Ruminococcus, Sarcina*

B) Cocos Gram negativos

aeróbicos	*Neisseria, Moraxella, Acinetobacter Paracoccus, Lampropedia*
anaeróbicos	*Veillonella, Acidaminococcus, Megasphaera*

2. Bacilos, bacterias cilíndricas rectas

A) Bacterias Gram positivas

	Bacilos Gram positivos no formadores de esporas
aeróbicos	*Lactobacillus, Listeria, Erysipelothrix, Caryophanon*
	Bacterias corineformes y actinomicetos
aeróbicos	*Corynebacterium, Arthrobacter, Brevibacterium, Cellulomonas, Propionibacterium, Eubacterium* *Bifidobacterium, Mycobacterium, Nocardia* *Actinomyces, Frankia, Actinoplanes, Dermatophilus, Micromonospora, Microbispora, Streptomyces, Streptosporangium*
	Bacilos y cocos formadores de endósporas
aeróbicos	*Bacillus, Sporolactobacillus, Sporosarcina, Thermoactinomyces*
anaeróbicos	*Clostridium, Desulfotomaculum, Oscillospira*

B) Bacterias Gram negativas

	Bacilos y cocos Gram negativos aeróbicos
aeróbicos	*Pseudomonas, Xanthomonas, Zoogloea, Gluconobacter, Acetobacter* *Azotobacter, Azomonas, Beijerinckia, Derxia* *Rhizobium, Agrobacterium, Alcaligenes* *Brucella, Legionella, Thermus*
	Bacterias Gram negativas, aeróbicas, quimiolitotrofas
aeróbicos	*Nitrobacter, Nitrospina, Nitrococcus, Nitrosomonas, Nitrosospira, Nitrosococcus, Nitrosolobus Thiobacillus, Thiobacterium, Thiovulum*

	Bacterias con vaina
aeróbicas	*Sphaerotilus, Leptothrix, Streptothrix, Crenothrix*
	Bacilos Gram negativos, anaeróbicos facultativos
anaeróbicos facultativos	*Escherichia, Klebsiella, Enterobacter, Salmonella, Shigella, Proteus, Serratia, Erwinia*
	Yersinia
	Vibrio, Aeromonas, Photobacterium
	Bacterias Gram negativas anaeróbicas
anaeróbicos estrictos	*Bacteroides, Fusobacterium, Leptotrichia, Fibrobacter*
	Arqueobacterias
anaeróbicos estrictos	*Methanobacterium, Methanothermus, Methanosarcina, Methanothrix, Methanococcus*
aeróbicos	*Halobacterium, Haloferax, Halococcus, Sulfolobus, Thermoplasma*
anaeróbicos	*Thermoproteus, Pyrodictium, Desulfurococcus, Pyrococcus, Thermococcus, Thermodiscus*

3. Bacilos curvados o células flexibles

	Bacterias Gram negativas, espiraladas o curvadas
aeróbicos	*Spirillum, Aquaspirillum, Azospirillum, Oceanospirillum, Helicobacter*
	Bdellovibrio, Microcyclus, Pelosigma
	Bacterias Gram negativas, curvadas, anaeróbicas
anaeróbicas	*Desulfovibrio*
	Succinivibrio, Butyrivibrio
	Selenomonas
	Espiroquetas
aeróbicas y anaeróbicas	*Spirochaeta, Cristispira, Treponema, Borrelia, Leptospira*

4. Grandes grupos especiales

	Bacterias deslizantes (siempre Gram negativas)
	Myxococcus, Archangium, Cystobacter, Melittangium, Stigmatella, Polyangium, Nannocystis, Chondromyces
	Cytophaga, Sporocytophaga, Flexibacter, Herpetosiphon, Saprospira

Beggiatoa, Thiothrix, Thioploca, Achromatium, Leucothrix, Vitreoscilla

Simonsiella, Alysiella

Bacterias con pedúnculos, prostecadas o gemantes
Hyphomicrobium, Hyphomonas
Caulobacter, Asticcacaulis, Planctomyces
Ancalomicrobium, Prosthecomicrobium, Blastobacter, Seliberia, Gallionella, Nevskia

Bacterias parásitas obligadas: rickettsias y clamidias
Rickettsia, Coxiella, Chlamydia

Grupo de los micoplasmas (Mollicutes)
Mycoplasma, Acholeplasma, Spiroplasma, Metallogenium

Bacterias anaeróbicas, fototróficas anoxigénicas
Rhodospirillum, Rhodopseudomonas, Rhodobacter, Rhodomicrobium, Rhodocyclus, Rhodopila

Chromatium, Thiocystis, Thiosarcina, Thiocapsa, Thiospirillum, Thiopedia, Amoebobacter, Ectothiorhodospira, Lamprocystis, Thiodictyon

Chlorobium, Prosthecochloris, Pelodictyon, Chloroherpeton

Chloroflexus, Chloronema, Oscillochloris

Bacterias aeróbicas, fototróficas oxigénicas: cianobacterias (Cianofíceas)
Synechococcus, Gloeocapsa, Gloeothece, Gloeobacter

Pleurocapsa, Dermocarpa, Myxosarcina

Oscillatoria, Spirulina, Lyngbya, Phormidium, Plectonema

Anabaena, Nostoc, Calothrix, Fischerella

3.3 Cocos Gram positivos

Entre los cocos Gram positivos en sentido amplio se cuentan las bacterias cocoidales del ácido láctico (*Streptococcus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*; pág. 302). Éstas sólo pueden obtener energía por fermentación, no contienen pigmentos hemínicos (con excepciones), y son microaerotolerantes. Frente a éstos se encuentran los géneros aeróbicos y anaeróbicos facultativos *Micrococcus* y *Staphylococcus*, así como los géneros anaeróbicos estrictos *Sarcina*, *Peptococcus*, *Peptostreptococcus* y *Ruminococcus*.

Al género *Micrococcus* pertenecen las bacterias pigmentadas cuyas colonias amarillas o anaranjadas aparecen frecuentemente en las placas expuestas al aire (pág. 84 y sig.). Debido a la formación de paquetes de células (tétradas) se las incluyó en el género *Sarcina*. Actualmente se ha reunido a *Sarcina lutea*, *S. flava*, y *S. aurantiaca*, entre otras, en *Micrococcus luteus*. También se encuentra entre ellos la especie *Micrococcus lysodeikticus*, así denominada por A. FLEMING debido a su elevada sensibilidad frente a la lisozima. *Micrococcus* es aeróbico y se caracteriza por un contenido elevado en GC (66-72%).

El nombre del género *Staphylococcus* se basa en su imagen microscópica; las células se ordenan como uvas en un racimo (staphyle) (Fig. 2.6); esta ordenación se debe a la división celular irregular en distintos planos. *Staphylococcus* es anaeróbico facultativo, sólo forma citocromos en condiciones aeróbicas y es relativamente resistente a la desecación. *Staphylococcus aureus* es patógeno (a través de toxinas y exoenzimas; piógeno). Otras cepas provocan intoxicaciones de alimentos ya que al desarrollarse sobre alimentos no enfriados excretan una enterotoxina.

Sarcina ventriculi (Fig 2.34) es una bacteria anaeróbica microaerotolerante que se aísla fácilmente de muestras de suelo, pero que también se presenta en el contenido estomacal de enfermos de estómago. Esta bacteria es poco corriente por su tamaño (diámetro celular de 4 µm), por la formación de paquetes celulares (más de 64 células se mantienen unidas por celulosa) por su tolerancia frente al pH (crecimientos entre pH 0,9 y 9,8), y por la capacidad de formar endósporas.

3.4 Cocos Gram negativos

En este grupo se reúnen algunos cocos o bacilos cortos que son Gram negativos e inmóviles. Se encuentran bacterias aeróbicas y anaeróbicas, dentro de las cuales algunas merecen atención por tratarse de causantes de enfermedades infecciosas, ser bacterias del suelo, o habitantes de las mucosas y del tracto intestinal de mamíferos.

Cocos aeróbicos. El género *Neisseria* es *oxidasa* positivo e incluye a bacterias patógenas de animales. *N. gonorrhoeae* es el causante de la gonorrea, una enfermedad venérea, que casi ha pasado al olvido debido a su extraordinaria sensibilidad frente a la penicilina (1 µg penicilina/ml ya es bacteriostático). *N. gonorrhoeae* es difícil de cultivar, necesita un 10% de CO_2 en la atmósfera, y es muy sensible frente a la luz y la sequedad, por lo que la transmisión sólo puede darse mediante un contacto íntimo directo. *N. meningitidis* se presenta en la cavidad nasofaríngea, pero también puede penetrar en la corriente sanguínea y desencadenar inflamaciones en las meninges. *Moraxella* es igualmente *oxidasa* positivo, y muy sensible a la penicilina. Son cocobacilos incapaces de utilizar hidratos de carbono. *Acinetobacter* es una bacteria de aguas y suelos *oxidasa* negativa. Se aísla fácilmente de enriquecimientos en medios de cultivo con acetato al 0,2% y a pH 5,5-6,0, y por lo general no utiliza la glucosa, disacáridos o polisacáridos, pero por lo demás, sobre todo en cuanto a la versatilidad de sustratos utilizables, se parece al género *Pseudomonas*. Entre los pertenecientes a la especie *Acinetobacter calcoaceticus* pueden transferirse caracteres genéticos por transformación. Como esta bacteria es capaz de almacenar mucho fosfato, se considera que con su ayuda se podrá eliminar el fosfato inorgánico de las aguas residuales.

La **reacción de la oxidasa**, importante para el diagnóstico diferencial de este grupo, se basa en la transformación de la dimetil-*p*-fenildiamina (*N*, *N*-dimetil-1,4-diaminobenzol) en un compuesto coloreado por el citocromo c soluble; se dejan caer unas gotas del reactivo sobre las colonias en agar y se observa la aparición de color púrpura azulado.

Cocos anaeróbicos. Los cocos anaeróbicos estrictos, Gram negativos, mejor conocidos son *Veillonella alcalescens* (antes denominado *Micrococcus lactilyticus*), y *Megasphaera* (antes *Peptostreptococcus*) *elsdenii*. Ninguno de los dos puede fermentar hidratos de carbono. *V. alcalescens* se encuentra en la saliva del hombre, de los animales y en la panza de los rumiantes. Fermenta ácidos orgánicos, sobre todo lactato a propionato, acetato, CO_2 y H_2 (pág. 311 y 459). *M. elsdenii* fermenta ácido glutámico y otros aminoácidos y aparentemente es también un habitante normal del tracto intestinal de los animales.

3.5 Bacilos Gram positivos no esporulados

Las bacterias Gram positivas no formadoras de esporas capaces de crecer en presencia de oxígeno y que forman principalmente ácido láctico en la fermentación de los hidratos de carbono (glucosa, lactosa), se reúnen bajo la denominación de "bacterias del ácido láctico". A ellas pertenecen los géneros *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Streptococcus*, *Pediococcus* y *Bifidobacterium*. Esta última es una de las pocas bacterias anaeróbicas del ácido láctico. Las bacterias del ácido láctico se tratan en el apartado 8.2. Todavía debemos citar otro bacilo Gram positivo aeróbico, *Listeria monocytogenes*, que apareció recientemente como contaminación de queso para untar y que provoca la listeriosis en los consumidores.

En base a la morfología celular y otras características fisiológicas puede ordenarse a las bacterias Gram positivas en una serie. Las bacterias del ácido láctico bacilares están al inicio de esta serie. La mayoría de las bacterias lácticas son bacilos de apariencia regular. La tendencia a formar células ramificadas o en forma de maza es en ellas muy incipiente. Esta variabilidad morfológica es ya una regla en las bacterias corineformes, a las que pertenecen los géneros *Corynebacterium* y *Arthrobacter*. Aún más manifiesta es la tendencia a la ramificación en las células de las micobacterias. Éstas conducen ya a los proactinomicetos, que forman un micelio transitorio. Al final de esta serie se encuentran los actinomicetos.

Muchos de estos grupos se pueden reconocer por la morfología celular, la forma colonial y por características fisiológicas. En el resto, la identificación sólo es posible por diversas características bioquímicas.

A modo de apéndice, introduzcamos aquí a *Caryophanon latum*. Es una bacteria flagelada formadora de tricomas, que puede aislarse regularmente de estiércol de vaca. Los bacilos Gram positivos estructurados en células (Fig. 3.4) son de un gran tamaño poco frecuente (3×15 µm).

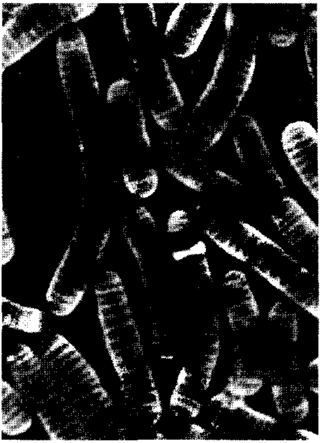


Fig. 3.4 ***Caryophanon latum*, una bacteria filamentosa de flagelación peritrica** (Foto M.P. PESHKOFF).

3.6 Bacterias corineformes

***Corynebacterium*.** El género *Corynebacterium* (coryne = maza) se creó inicialmente (1896) para reunir las formas del tipo de *Corynebacterium diphtheriae*. Además de la variabilidad morfológica, la rotura (snapping) en la división celular es característica; consiste en que las células forman un ángulo como consecuencia de roturas más o menos rápidas de la pared que las une a ambos lados de la nueva pared celular. Además también tiene lugar una división múltiple simultáneamente, de forma que a partir de una célula grande aparecen muchos bacilos cortos. *Corynebacterium diphtheriae* es el causante de la difteria. Desde el punto de vista fisiológico es un representante atípico del grupo, ya que vive como microaerófilo, hasta en condiciones anaeróbicas, mientras que la gran mayoría de corinebacterias son aeróbicas. Su patogenicidad se debe a su implantación en la cavidad faríngea y en las amígdalas, y a la excreción de una exotoxina que circula con la sangre y actúa sobre el miocardio, los riñones y los nervios ("parálisis postdiftéricas"). Sólo son toxigénicas las cepas lisogenizadas por el fago β. La síntesis de la toxina es una consecuencia de la modificación genética de la bacteria por el fago, fenómeno también llamado **conversión fágica**. Por otra parte, la toxina se forma únicamente cuando los suministros de hierro para la célula son subóptimos.

Al género *Corynebacterium* pertenecen especies patógenas de animales y otros muchos y muy abundantes causantes de enfermedades en plantas (*C. michiganense*, *C. poinsettiae*, *C. fascians*). *C. mediolaneum* se utilizó como primera bacteria en la transformación biológica de esteroides (1938).

Arthrobacter. En el género *Arthrobacter* se incluyen varias de las bacterias corineformes abundantemente extendidas en los suelos. Este género se caracteriza por una gran tendencia a la ramificación de las células y a la formación de cocos. Algunas formas son móviles mediante flagelos y todas las especies son aeróbicas. *Arthrobacter* se puede aislar fácilmente de suelos secos. *Arthrobacter* y *Bacillus* resisten una desecación de varios meses del suelo, mientras que la mayoría de los no esporulados mueren. *Arthrobacter* es pleomórfico (varias formas); en colonias jóvenes y en cultivos líquidos también jóvenes crece en forma de bacilos largos de apariencia regular; los cultivos viejos sólo presentan células cocoidales (véase Fig. 3.5). Entre las bacterias corineformes del suelo se cuentan también algunas especies celulolíticas del género *Cellulomonas*.

Las formas del género *Arthrobacter* se encuentran en distintos hábitats. *Arthrobacter* parece ser el representante numéricamente más abundante de la **flora autóctona del suelo**; esto es, predomina en suelos en los que la materia orgánica fácilmente descomponible se degrada, y en los que resta el humus como fracción principal de la materia orgánica. En condiciones desfavorables *Arthrobacter* puede crecer lentamente en su fase cocoidal. Se cree que el número predominante de cocos encontrados en el suelo por WINOGRADSKY eran células de *Arthrobacter*. Otras células de *Arthrobacter* se encuentran en plantas y en los lodos de las depuradoras.

Otros géneros y especies. Muchas bacterias corineformes excretan ácido glutámico (pág. 372) y otros aminoácidos en el medio de cultivo; debido a estas características han adquirido interés industrial. Otras formas típicas cre-

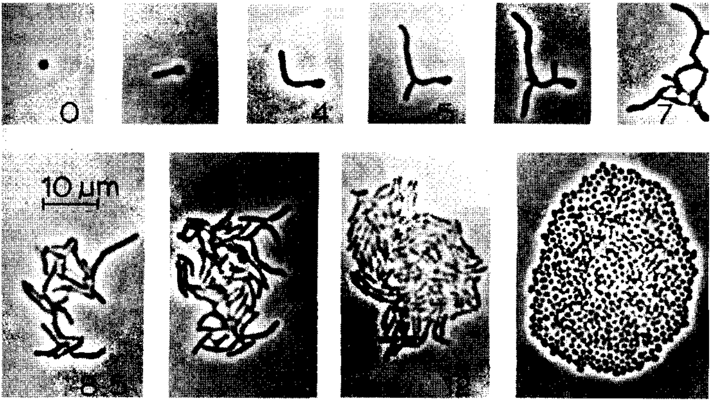


Fig. 3.5 Desarrollo de una microcolonia de *Arthrobacter pyridinolis* sobre una película de agar. Las cifras indican el tiempo de incubación en horas. Foto al microscopio de contraste de fases (de KOLENBRANDER, P.E., N. LOTONG, J.C. ENSIGN: Arch. Microbiol. 110 [1976] 239).

cen sobre quesos blandos, por ejemplo *Brevibacterium linens*, son algo proteolíticos y actúan en la maduración del queso. Entre las bacterias corineformes se cuentan recientemente también a las propionibacterias (pág. 310).

Las **bacterias corineformes** toman morfológicamente y fisiológicamente una posición intermedia entre las bacterias del ácido láctico y las micobacterias. La tendencia a la ramificación va en aumento en las propionibacterias y las corinebacterias en sentido estricto, hasta las micobacterias. Además, en esta serie puede apreciarse una transición del metabolismo anaeróbico hasta el aeróbico estricto. A pesar de repetidos intentos aún no ha sido posible diferenciar claramente entre sí los géneros reunidos en el grupo de las bacterias corineformes. El conocimiento de los contenidos GC, la composición de la mureína, así como la aplicación de los métodos de la taxonomía numérica son la base para una nueva ordenación de este grupo extraordinariamente importante y ecológicamente diferenciado.

3.7 Micobacterias

Las micobacterias son siempre respiradores aeróbicos. Por su morfología se sitúan entre las corinebacterias y los proactinomicetos (nocardias). No forman micelio, sino que crecen como células de forma irregular, ligeramente ramificadas. Son Gram positivas e inmóviles. Se diferencian de las corinebacterias por su **"ácido resistencia"**. En 1882 EHRLICH observó que las bacterias de la tuberculosis (*Mycobacterium tuberculosis*) no se decoloraban al tratarlas con un ácido después de haberlas teñido con colorantes de anilina. Según la técnica de ZIEHL-NEELSEN, un frotis de bacterias fijadas se calienta con carbolfucsina, se lava y se diferencian con alcohol clorhídrico. Las micobacterias y nocardias no liberan el colorante durante este tratamiento ácido; son ácido-resistentes. Algunas micobacterias saprófitas pueden decolorarse con alcohol clorhídrico, pero no con clorhídrico acuoso. La ácido-resistencia se debe al elevado contenido de la pared celular en ácidos micólicos, que hacen que las células de las micobacterias sean de características céreas y fuertemente hidrófobas.

Con respecto a la composición de la pared celular *Corynebacterium*, *Mycobacterium* y *Nocardia* presentan semejanzas y diferencias. La estructura de mureína es semejante a la de las bacterias Gram negativas; no obstante, está unida a un arabinogalactano, un polisacárido compuesto de arabinosa y galactosa. A éste se unen lípidos, los **ácidos micólicos**. Se trata de 3-hidroxiácidos ramificados (R^1–CHOH–CHR^2–COOH), sustituidos en las posiciones 2 y 3 por cadenas alifáticas. Estas cadenas son de longitud variable. Los ácidos micólicos de las corinebacterias tienen de 32 a 36 átomos de carbono, los de las nocardias de 48 a 58, y los de las micobacterias de 79 a 85. Los ácidos micólicos de cadena larga son los únicos que confieren ácido resistencia.

Mycobacterium tuberculosis es el causante de la tuberculosis humana y R. KOCH lo describió ya en 1882. La infección de los pulmones conduce a la formación de unos tubérculos y destrucción de los tejidos pulmonares, así como a la diseminación de focos tuberculosos en el cuerpo. La enfermedad se produce sobre todo en casos de malnutrición y debilidad. La enfermedad ha sido prácticamente eliminada gracias a los antibióticos penicilina y estreptomicina, así como del quimioterápico hidracina del ácido isonicotínico (INH). El INH impide la síntesis de ácido micólico y conduce así a la pérdida de la ácido resistencia y mata a *M. tuberculosis* ya a pequeñas concentraciones. En los trópicos muchos millones de hombres padecen todavía la enfermedad de la lepra. El causante, *Mycobacterium leprae*, crece en la piel, causa inflamaciones y conduce a la destrucción de los tejidos en la cara, extremidades y lesiona a los nervios. La terapia aún no es tan efectiva como la de la tuberculosis.

Sin embargo, las micobacterias también están distribuidas en los suelos. Muchas pueden crecer con parafinas, hidrocarburos aromáticos e hidroaromáticos, y pueden hacerse crecer sobre medios minerales, que contengan únicamente sales, en una atmósfera de petróleo, naftaleno u otros hidrocarburos volátiles, a partir de grumos de tierra. Mientras que las especies patógenas necesitan medios complejos y crecen lentamente, las bacterias del suelo no requieren ningún suplemento y crecen relativamente rápido.

3.8 Actinomicetos en sentido estricto

Entre los actinomicetos en sentido estricto hay que contar las bacterias que crecen formando un micelio. Habitan preferentemente los suelos. Son Gram positivos y están relacionados con las bacterias corineformes y las micobacterias a través de una serie de formas de transición casi ininterrumpida. Viven aeróbicamente con pocas excepciones.

La denominación hace referencia a la primera descrita, especie anaeróbica, *Actinomyces bovis*, el causante de la actinomicosis, el "hongo estrellado" (enfermedad del ganado vacuno). Las grandes glándulas que se forman en los tejidos y huesos mandibulares tienen una estructura estrellada.

Los **actinomicetos** pueden cultivarse bien en medios de cultivo sencillos y diferenciarse por su crecimiento sobre o en el agar, por la formación de un micelio aereo (Ma), un micelio basal (Mb), la formación de esporangios, esporas, etc. (Fig. 3.6 y 3.7). Los **proactinomicetos** (género *Nocardia*) forman un micelio basal y otro aéreo, que en las colonias viejas se descompone en células bacilares; no se forman verdaderas esporas (Fig. 3.6 y 3.8).

Frente a éstos, el micelio de los pertenecientes al gran género de los ***Streptomyces*** se mantiene; en ellos el micelio aéreo suele estar muy desarrollado y contiene hifas aéreas (esporóforos), de las que se separan los conidios para la diseminación. La estructura de estos esporóforos (si son rectos, ondulados, espiralados, arrollados, helicoidales, etc.), la morfología colonial, color, tamaño, así como también el olor, son características para diferenciar las numerosas especies y cepas. A los estreptomicetos se debe también el olor que desprenden en primavera los suelos recién roturados. De *S. griseus* se aisló un aceite que es el responsable del olor y que se denomina geosmina; se trata de un 1,10-dimetil-9-decaiol. El conocimiento de los estreptomicetos se ha enriquecido mucho debido a su significación industrial como productores de antibióticos muy activos. La estreptomicina (*S. griseus*), la cloromicetina (*S. venezuelae*), la aureomicina y la tetraciclina (*S. aureofaciens*) son los antibióticos terapéuticamente más activos de los cientos que se han aislado.

Muchos estreptomicetos descomponen la celulosa, la quitina y otros productos naturales difícilmente degradables. Un celulolítico muy extendido en los lodos de los ríos y en el suelo es *Micromonospora*; las colonias son planas, no forma micelio aéreo, las esporas están aisladas en el extremo de esporóforos ligeramente ramificados. *Microbispora* tiene un aspecto semejante, pero forma micelio aéreo y en cada uno de los dos conidios.

Algunos actinomicetos (*Actinoplanes*, *Streptosporangium*, *Ampullariella*) no forman esporas libres en hifas aéreas, sino en esporangios. *Streptosporangium* es un estreptomiceto celulolítico aeróbico. Sobre medios de

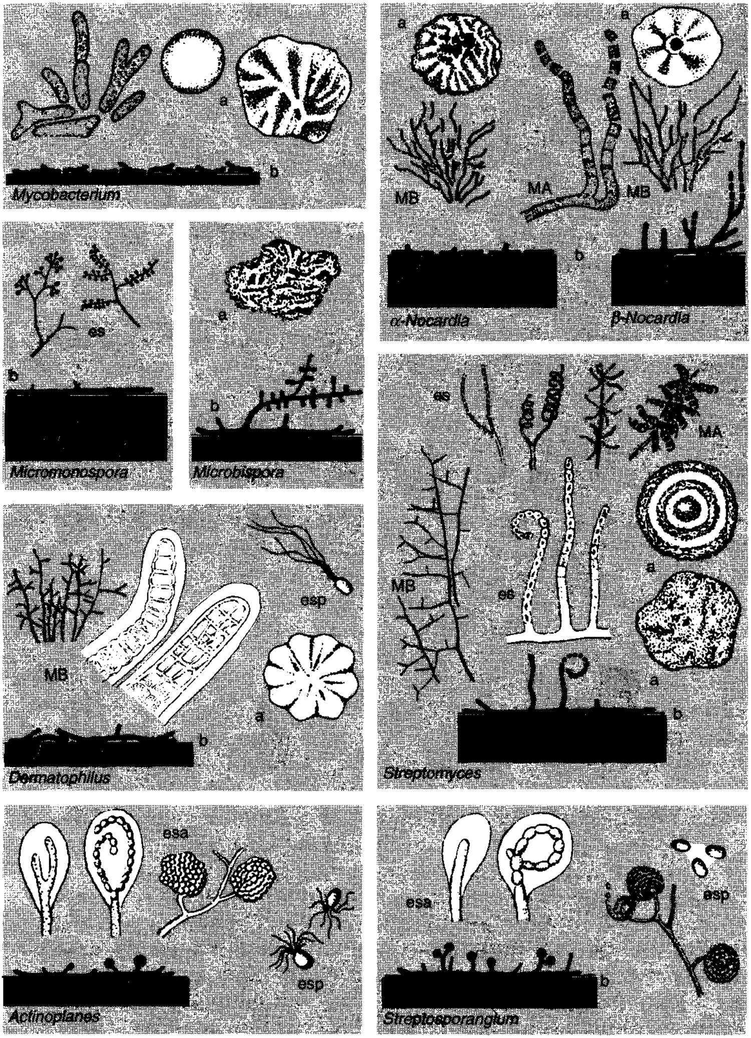

a
b
Mycobacterium
a
a
MB
MA
MB
b
α-Nocardia
β-Nocardia
es
b
Micromonospora
a
b
Microbispora
es
MA
MB
es
a
a
b
Streptomyces
MB
esp
a
b
Dermatophilus
esa
esp
Actinoplanes
esa
esp
b
Streptosporangium

Fig. 3.6 Micobacterias, nocardias y actinomicetos. Se representa **a** la forma colonial representativa de cada uno de los géneros; **b** una sección a través del crecimiento en la superficie de agar; las formas de crecimiento típicas del micelio basal (MB) y del micelio aéreo (MA), los esporóforos (es) y los esporangios (esa) así como las esporas con y sin flagelos (esp).

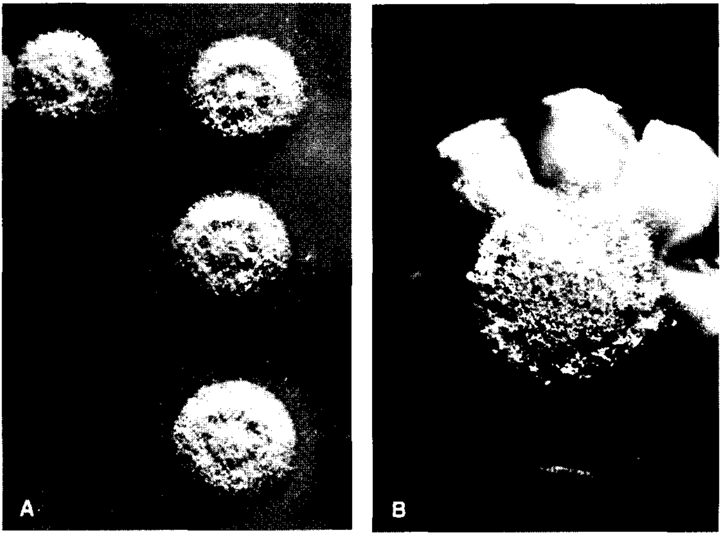


Fig. 3.7 Formas coloniales de estreptomicetos. A Colonias de *Streptomyces* con micelio aéreo después de cinco semanas de crecimiento sobre agar glicerina-nitrato; **B** inicio de la formación del micelio aéreo en una colonia de una cepa de *Streptomyces* (Fotos P. Hirsch).

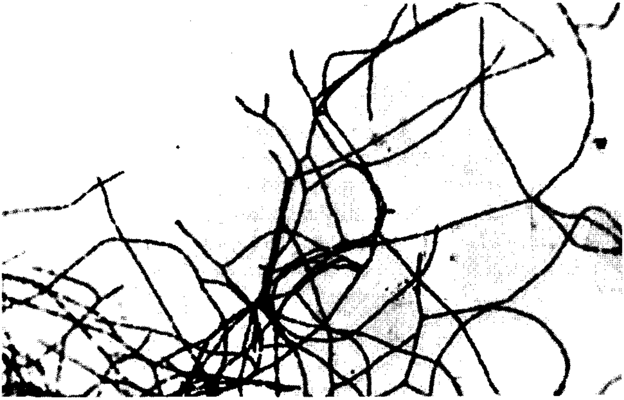


Fig. 3.8 Hifas basales de *Nocardia saturnea*. Foto al microscopio óptico de un frotis teñido con carbolfucsina (Foto P. Hirsch).

cultivo sólidos crece primero con un micelio basal y forma posteriormente un micelio aéreo. Los extremos del micelio aéreo se engrosan y forman esporangios esféricos de 5-8 µm de diámetro, que en la madurez alcanzan hasta 18 µm. La hifa que los soporta crece hacia el interior de la célula terminal esferoidal, se enrolla en espiral y va liberando esporangiósporas. Éstas son inmóviles en *Streptosporangium*. *Actinoplanes* se introduce en restos vegetales y forma igualmente esporas en el interior del esporangio en forma de cabezuela. Al abrirse, las esporangiósporas son móviles por un penacho de flagelos.

Otro actinomiceto formador de esporas móviles es *Dermatophilus congolensis*. Es el causante de una dermatosis en corderos y caballos bastante extendida que determina la caída de la piel del lomo; sobre medios de cultivo sólidos forma colonias lisas o rugosas, y forma un micelio basal denso. Las hifas se dividen longitudinal y transversalmente, formándose hasta ocho series paralelas de células cocoidales, que pueden liberarse por gelatinización y disolución de la pared de la hifa. Las esporas cocoidales son móviles por flagelos.

Las esporas de los actinomicetos no son resistentes frente al calor, pero resisten la desecación. El único actinomiceto que forma esporas resistentes al calor es *Thermoactinomyces vulgaris*. Es termófilo y pertenece a la flora bacteriana que en los almacenamientos húmedos de heno y desechos orgánicos conduce al autocalentamiento. Estas esporas se asemejan a las de *Bacillus* y *Clostridium* en la constitución y en el contenido en ácido dipicolínico.

3.9 Bacilos y cocos formadores de endósporas

La capacidad de formar esporas más o menos resistentes al calor se limita, con pocas excepciones, a un grupo de bacilos, la mayoría de los cuales son móviles gracias a flagelos de inserción peritrica. Son Gram positivos. Los bacilos aeróbicos y anaeróbicos facultativos están en el género *Bacillus* y los anaeróbicos en los géneros *Clostridium* y *Desulfotomaculum*. Muchos formadores de esporas son bien conocidos debido a sus capacidades bioquímicas. Aquí presentaremos únicamente a algunos representantes de los grandes géneros *Bacillus* y *Clostridium*.

Formadores de esporas aeróbicos. Los formadores de esporas aeróbicos se encuentran en los suelos. Muchos bacilos forman cadenas de células o filamentos. El género *Bacillus* puede subdividirse en tres grupos atendiendo a la forma de las esporas en la célula madre (Fig. 3.9): (I) Oval o cilíndrica no más ancha que la célula madre. Es la espora de la mayoría de los bacilos (*B. megaterium*, *B. cereus*, *B. subtilis*, *B. licheniformis*, *B. anthracis*, *B. thuringiensis*). (II) Las esporas ovales son más anchas que la

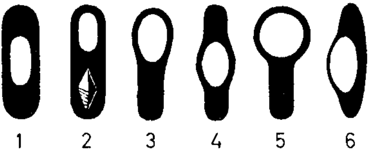


Fig. 3.9 Representación esquemática de las formas típicas de las células formadoras de esporas. **1** Espora central sin deformar al esporangio (*Bacillus megaterium*); **2** Espora terminal sin deformar al esporangio (*Bacillus thuringiensis* con un cuerpo de inclusión proteico); **3** Espora terminal, esporangio deformado en maza (*Bacillus macerans*); **4** Espora central, esporangio deformado en huso = forma de clostridio (*Bacillus polymyxa*); **5** Espora terminal, redonda, esporangio deformado en palillo de tambor = forma de plectridium (*Bacillus sphaericus*); **6** Espora lateral, esporangio deformado en huso (*Bacillus laterosporus*).

célula materna; hichan a ésta durante la esporulación (*B. polymyxa*, *B. macerans*, *B. stearothermophilus*, *B. circulans*). (III) Esporas casi redondas en células hinchadas terminalmente (*B. pasteurii*).

I. *Bacillus megaterium*, con unas dimensiones celulares de 2 × 5 µm es un gigante entre las eubacterias. *B. cereus* es algo más pequeño. En esta especie se cuenta actualmente también una variante llamada "*mycoides*" (*B. cereus* var. *mycoides*) que sobre superficies sólidas tiene un crecimiento semejante al fúngico; existen cepas que "giran a la derecha y otras a la izquierda"; el aspecto colonial es inconfundible (Fig. 3.10). Muy emparentado con *B. cereus* está también el causante del ántrax o carbunco, *B. anthracis*, que no es flagelado y está rodeado de una cápsula de ácido glutámico; también próximo a él, es el patógeno de insectos *B. thuringiensis*. Tanto *B. subtilis*, llamado también "bacilo del heno" porque puede enriquecerse y aislarse de infusiones de heno, como *B. licheniformis* forman antibióticos polipeptídicos. El último no sólo obtiene energía por respiración, sino que también puede fermentar y respirar nitratos.

II. *B. polymyxa* (antes *B. asterosporus*) recibe su nombre debido a la intensa formación de limos (y a las esporas en forma de pequeño tonel, de forma estrellada en la sección transversal). Igual que *B. licheniformis*, forma 2,3-butanodiol. *B. stearothermophilus* es un organismo marcadamente termófilo (temperatura óptima de crecimiento 50-65°C).

III. *B. pasteurii* es considerado como el "degradador de urea" clásico; sintetiza *ureasa* de forma constitutiva, hidroliza la urea a CO_2 y amonio, y está adaptado a elevados valores de pH. Fisiológicamente semejante es *Sporosarcina ureae*; desde el punto de vista morfológico pertenece en realidad a las sarcinas, pero debido a las características fisiológicas debe incluirse en los bacilos (termorresistente, esporas con ácido dipicolínico, aeróbico).

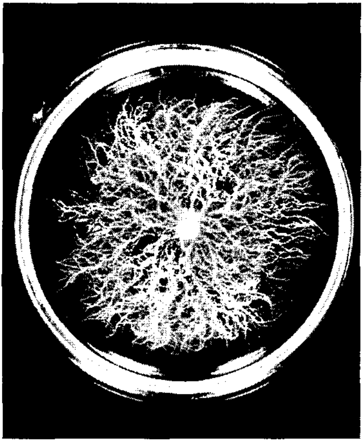


Fig. 3.10 Filamentos celulares de *Bacillus cereus* var. *mycoides*. Éstos crecen sobre un medio de cultivo con agar formando una colonia de aspecto semejante a las de los hongos (Foto D. CLAUS).

Formadores de esporas anaeróbicos. Los esporulados anaeróbicos no requieren oxígeno para el crecimiento. Las especies de *Clostridium* no contienen ningún citocromo ni *catalasa*. Debido al elevado contenido en enzimas flavínicos muchos clostridios forman peróxido de hidrógeno cuando entran en contacto con el oxígeno del aire que es tóxico para las células. Las bacterias esporuladas reductoras de sulfatos se han separado del género *Clostridium* por su contenido en pigmentos del tipo protohemínico, y se han reunido en otro nuevo, *Desulfotomaculum* (*nigrificans*, *orientis*, *ruminis*). En los formadores de esporas anaeróbicos la espora es significativamente más ancha que la célula vegetativa. La célula madre presenta distintas formas según la situación de la espora.

Los clostridios fermentan una gran cantidad de sustratos, (entre ellos polisacáridos, proteínas, aminoácidos y purinas; apartado 8.5). Por ello, según los grupos de sustratos preferidos puede diferenciarse entre **clostridios sacarolíticos** (*Clostridium butyricum*, *C. acetobutylicum*, *C. cellulosae-dissolvens*), **pepto-clostridios** (*C. histolyticum*, *C. sporogenes*, *C. tetani*, *C. botulinum*), y **clostridios ureolíticos** (*C. acidi-urici*). Los productos de fermentación son butirato, butanol, acetona, 2-propanol y en muchos casos grandes cantidades de gas (H_2, CO_2). *C. pasteurianum* y otros muchos clostridios sacarolíticos fijan el nitrógeno molecular. *C. aceticum* transforma a la fructosa, o a una mezcla de anhídrico carbónico e hidrógeno molecular, en acetato.

En forma de anexo debemos citar a *Oscillospira guilliermondii*, una bacteria anaeróbica formadora de esporas, con ordenación celular y extraordinariamente grande (5 × 100 µm). Se ha encontrado repetidas veces en el intestino ciego del conejillo de Indias y también en la panza.

3.10 Pseudomonas y otros bacilos Gram negativos

Se ha generalizado denominar "pseudomonas" a todos los bacilos Gram negativos de flagelación polar. De esta forma se hace referencia frecuentemente a eubacterias fisiológicamente tan extremadamente especializadas como *Nitrosomonas*, *Methylomonas*, los tiobacilos y también las bacterias fototrofas (*Rhodopseudomonas*). La palabra en este sentido amplio sólo tiene un significado morfológico y no hace referencia a ninguna característica taxonómica.

En la familia de las Pseudomonadáceas se incluyen los bacilos rectos o ligeramente curvados, Gram negativos, de flagelación polar, incapaces de formar esporas y que crecen aeróbicamente. La ganancia energética tiene lugar por respiración aeróbica, en algunas especies por respiración anaeróbica (desnitrificación, respiración de nitratos), pero no por fermentación. Los pseudomonas son quimioorganotrofos, aunque algunos crecen quimiolitotróficamente de forma facultativa. El género *Pseudomonas* encarna al prototipo de la familia y se caracteriza por los siguientes distintivos de la familia. Desde el punto de vista fisiológico y metabólico los pseudomonas se caracterizan por el amplio espectro de sustratos orgánicos utilizables. También utilizan un gran número de compuestos heterocíclicos y aromáticos, que no son atacados por otras bacterias. Los azúcares se degradan generalmente por la vía de ENTNER-DOUDOROFF (pág. 252). Algunas especies de *Pseudomonas* oxidan los azúcares de forma incompleta y excretan los ácidos correspondientes (gluconato, 2-oxogluconato).

Debido a su falta de requerimientos los pseudomonas se encuentran en todas partes: tanto en suelos como en aguas, aguas residuales o en el aire. Si un medio de cultivo con sales minerales y ácidos orgánicos o azúcares queda expuesto al aire, por lo general los pseudomonas son los primeros colonizadores. Frecuentemente se reconocen por la formación de pigmentos hidrosolubles, como la piocina, derivado azul verdoso de la fenazina, y pigmentos amarillo verdosos fluorescentes. Algunos de los pigmentos fluorescentes liberados tienen función de sideróforos.

Especies de *Pseudomonas*. *Pseudomonas aeruginosa* (antes *P. pyocyanea*) es una bacteria acuática, que puede atacar también al hombre como oportunista y desencadenar inflamaciones del oído medio, infecciones de heridas con formación de un pus azul verdoso y en los individuos debilitados puede provocar incluso bacteriemias. *P. fluorescens* y *P. putida* son bacterias de aguas y suelos ampliamente distribuidas, que pueden oxidar un número insólitamente alto de sustancias orgánicas distintas. Muchas de las cepas patógenas de vegetales se reunieron hace poco en una especie, *P. syringae*. En *P. saccharophila*, una bacteria del hidrógeno, se descubrió la vía de ENTNER-DOUDOROFF de la degradación de la glucosa.

Xanthomonas. Los pseudomonas patógenos de vegetales, de pigmentación amarilla se han reunido en el género *Xanthomonas*. El pigmento amarillo es un compuesto poliénico que contiene bromo. Hay cepas de *Xanthomonas campestris* que excretan exopolisacáridos difíciles de degradar enzimáticamente (xantanas), que se obtienen industrialmente y que se añaden en disoluciones acuosas para elevar la viscosidad (budín, sopas dietéticas, tinta de imprenta).

Otros bacilos aeróbicos Gram negativos. Muy parecidos desde el punto de vista metabólico son los géneros *Alcaligenes*, *Agrobacterium*, *Rhizobium* y las bacterias del ácido acético *Acetobacter* y *Gluconobacter* (pág. 363), y las bacterias de vida libre fijadoras de nitrógeno (*Azotobacter*, *Beijerinckia*, *Derxia*; pág. 446).

Alcaligenes, Rhizobium, Agrobacterium. Los géneros citados abarcan bacterias que se asemejan a los pseudomonas por su metabolismo energético (respiración), pero que no tienen una flagelación polar, sino subpolar o sólo con 2-6 flagelos (degenerados) peritricos. A *Alcaligenes* pertenece *A. eutrophus*, bacteria del hidrógeno autótrofa facultativa (Fig. 2.39; pág. 401). *Rhizobium* se caracteriza por la capacidad de fijar nitrógeno como endosimbionte de plantas leguminosas (pág. 442). *Agrobacterium tumefaciens* produce tumores en el cuello de las raíces, en el vástago o en las hojas de diversas plantas (pág. 163).

Bacterias quimiolitotrofas. Las bacterias quimiolitotrofas aeróbicas (Cap. 11) se caracterizan por su capacidad para utilizar iones inorgánicos o compuestos como dadores de hidrógeno o de electrones. Como carbono pueden utilizar anhídrido carbónico y fijarlo a través del ciclo de la ribulosabisfosfato. No obstante, la mayoría de estas bacterias son autótrofas facultativas y pueden utilizar también sustratos orgánicos. Entre los autótrofos hay muchos géneros representados, entre ellos *Pseudomonas, Alcaligenes, Aquaspirillum, Xanthobacter, Mycobacterium, Bacillus* y *Nocardia*.

Bacterias con vaina. La bacteria filamentosa mejor conocida es *Sphaerotilus natans*. Esta bacteria, conocida como "hongo de las aguas residuales" crece en las aguas corrientes contaminadas, en las aguas residuales de fábricas de azúcar, en presas y en filtros de percolación. Forma filamentos y flóculos, o bien, si se deposita sobre un sustrato, determina recubrimientos y capas en forma de piel. En poco tiempo *Sphaerotilus natans* puede obturar cañerías, conducciones de aguas residuales y fosas.

Sphaerotilus natans es una bacteria unicelular, Gram negativa, de flagelación polar politrica, que podría incluirse en los pseudomonas. Lo característico es su forma de crecimiento. Crece en forma de filamentos largos formados por cadenas de células, que se mantienen reunidas mediante una vaina tubular delgada (Fig. 3.11). La vaina es un heteropolisacárido y

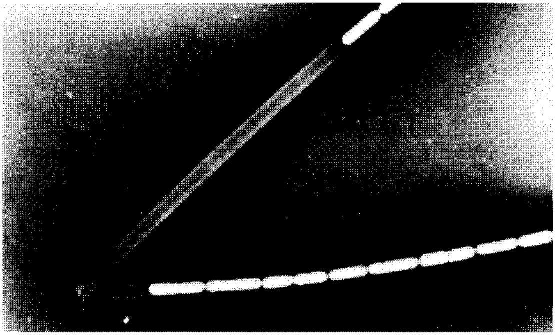


Fig. 3.11 ***Sphaerotilus natans*** **con células en una vaina parcialmente vaciada** (de STOKES, J.L.: J. Bacteriol. 67 [1954] 278).

puede considerarse como una sustancia capsular. Las bacterias se reproducen en el interior de la vaina por división transversal, y pueden abandonar la vaina como células móviles. Sobre medios de cultivo sólidos se da frecuentemente una "disociación". Aparecen dos tipos coloniales: las rugosas están constituidas por filamentos y las lisas por células aisladas. Desde el punto de vista del tamaño celular, del grosor de los filamentos y de características secundarias se distinguen varias especies.

Las bacterias filamentosas ampliamente distribuidas en aguas ferruginosas, que contienen $Fe(OH)_2$, en fosas, fuentes, conducciones de drenaje y pantanos, se describieron inicialmente como *Leptothrix ochracea* o "bacterias ocres". Su hábitat natural es pobre en materia orgánica utilizable, pero rico en hierro. Las vainas están por ello impregnadas y rodeadas de depósitos de óxido de hierro. Desde las investigaciones de WINOGRADSKY (1888) se consideró que se trata de bacterias autótrofas oxidadoras del hierro. Como las investigaciones fisiológicas y bioquímicas no han demostrado esta suposición, se ve en *Leptothrix ochracea* y en *Cladothrix dichotoma,* que se diferencian por su forma de crecimiento, únicamente variantes de distintos hábitats del mismo *Sphaerotilus.*

3.11 Bacilos Gram negativos, anaeróbicos facultativos

Los miembros de este grupo sistemático se caracterizan por sus productos de fermentación; bajo condiciones anaeróbicas obtienen la energía necesaria por fermentación y liberan varios ácidos orgánicos al exterior. Entre ellos está el ácido fórmico, que no es el mayoritario, pero sí el producto característico. Dado que los representantes característicos de este grupo, como *Escherichia coli, Salmonella* y *Shigella* son habitantes del tracto intestinal ("enteron") a todos los miembros de este grupo se les reúne en las Enterobacteriáceas. Se describen en el apartado 8.4.

3.12 Bacterias anaeróbicas Gram negativas

Las bacterias bacilares o en forma de vibrio, Gram negativas y anaeróbicas se encuentran abundantemente en los ecosistemas anaeróbicos. En gran parte a causa de su sensibilidad frente al oxígeno y a sus requerimientos de CO_2 se debe el que se hayan estudiado con cierto retraso y se haya reconocido tardíamente su predominancia en el sistema intestinal, la panza y en los sedimentos. Los bacilos son inmóviles o móviles mediante flagelos.

Especies del género *Bacteroides* (*B. fragilis, B. succinogenes*) forman la flora dominante de Gram negativos en los excrementos humanos. La masa de las deposiciones puede llegar a tener un 30% (peso/peso) de bacterias. En 1 g de peso húmedo se cuentan 10^{10} células de *Bacteroides*, de 10^6 a 10^8 coliformes y casi tantos estreptococos y lactobacilos. La relación entre anaeróbicos estrictos y anaeróbicos facultativos es aproximadamente de 40:1. Las especies del género *Bacteroides* son exclusivamente fermentadoras y transforman la glucosa en succinato, acetato, formiato, lactato y otros ácidos.

Fusobacterium debe su nombre a la morfología de huso. Son bacilos relativamente largos. El género se caracteriza bien por su principal producto de fermentación, el butirato. Diversas especies se presentan en el intestino, los excrementos y en la boca.

El género *Leptotrichia* tiene forma de filamento no flagelado de hasta unos 200 µm de largo. *L. buccalis* se encuentra en la boca. El producto principal en la fermentación de la glucosa es el ácido DL-láctico.

Los tres géneros clasificados como bacterias en forma de vibrio (*Selenomonas, Butyrivibrio, Succinivibrio*) se tratarán en el apartado 3.14 o se estudiarán en relación con sus capacidades ecológicas y fisiológicas (*Desulfovibrio*, apartado 9.2; *Selenomonas*, apartado 8.3; *Butyrivibrio*, apartado 8.5).

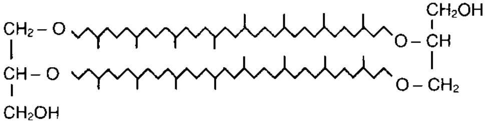
3.13 Arqueobacterias

Las arqueobacterias se diferencian de todas las demás bacterias, las eubacterias, por características muy singulares y siempre se encuentran en hábitats extremos. Estas condiciones extremas se asemejan a las que tienen que haber dominado los primeros tiempos de la evolución de la Tierra –los tiempos arcaicos. Las arqueobacterias engloban a aeróbicos y anaeróbicos litoautótrofos y heterótrofos. Los miembros de este grupo están relacionados entre sí por muchas características comunes y así se diferencian de las eubacterias. No obstante, entre los pertenecientes a este grupo parece haber diferencias (respecto a morfología, componentes celulares y metabolismo) tan grandes como entre las eubacterias. Los conocimientos actuales permiten ordenar a las arqueobacterias en **tres grupos**: bacterias metanogénicas, halobacterias y bacterias termoacidófilas.

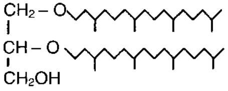
Características comunes. Hay toda una serie de características comunes de las arqueobacterias que hacen referencia a la composición de la pared celular, los lípidos, los aparatos de transcripción y de traducción, coenzimas y grupos prostéticos, los mecanismos de la fijación autotrófica del CO_2 y la obtención de energía. Aunque los resultados de la investigación todavía tienen muchos huecos, intentaremos resumir una visión global.

La **pared celular** no tiene ningún esqueleto de glucopéptido, sino que en el mejor de los casos consta de pseudomureína o sólo de proteínas y polisacáridos. A ello se debe su resistencia frente a los antibióticos penicilina, cefalosporina o D-cicloserina, que afectan a la síntesis de la pared celular.

La **membrana citoplasmática** contiene éteres de glicerina con radicales alquílicos isoprenoides de C_{20} (fitanilo) y C_{40} (bifitanilo) en lugar de ésteres de glicerina y ácidos grasos.



dialquil-diglicerín-tetraéter



dialquil-glicerín-diéter

Las *RNA-polimerasas* DNA-dependientes se diferencian de las de las eubacterias por su composición, que es de más de cuatro subunidades e insensible frente a los antibióticos rifampicina y streptolidigina. Los ácidos nucleicos ribosómicos (16S y 5S) se diferencian ampliamente en su secuencia de nucleótidos con respecto a las eubacterias. La traducción es resistente al cloranfenicol, pero se inhibe por la toxina diftérica, que es inactiva frente a las eubacterias, pero inhibe la síntesis proteica de los eucariotas.

Entre los **coenzimas** y los **grupos prostéticos** se encuentran componentes que son semejantes, pero no idénticos, a los de las eubacterias y los eucariotas: el F_{420} (derivado de la 5 deazorriboflavina), el F_{430} (factor tetrapirrólico de níquel), la metanopterina, el coenzima M y otros. Estos factores se descubrieron en las bacterias metanogénicas (apartado 9.4). Aún no pueden hacerse generalizaciones.

La **fijación autotrófica de CO_2** no discurre a través del ciclo de la ribulosabifosfato. Las bacterias metanogénicas fijan el CO_2 por la vía del acetil-CoA apartado 9.4). No obstante, algunas eubacterias también lo utilizan.

El proceso de la **transformación energética (regeneración de ATP)** se basa probablemente en la formación de un potencial de protones y en la función de una *ATP-sintasa* y puede interpretarse como una "respiración anaeróbica" primitiva. Como aceptores de electrones actúan el CO_2, el azufre o, en algunas pocas arqueobacterias, el oxígeno.

Bacterias metanogénicas. Entre las metanogénicas pueden encontrarse casi todas las formas conocidas en las eubacterias: cocos (*Methanococcus vannielii*), bacilos (*Methanobacterium formicicum*), bacilos cortos (*Methanobrevibacter ruminantium, M. arboriphilicus*), espirilos (*Methanospirillum hungatei*), paquetes de cocos (*Methanosarcina barkeri*) o filamentos (*Methanothrix soehngenii*) o incluso bacterias aplanadas (*Methanoplanus limicola*). Existen especies mesófilas y termófilas (*Methanobacterium thermoautotrophicum, Methanothermus fervidus*). Ya se diferencian actualmente 6 familias, y el número de géneros y especies descritos aumenta constantemente. Los contenidos en GC varían entre 27 y 61 mol %. La ecología y el metabolismo se indican en el apartado 9.4.

Halobacterias. Los géneros *Halobacterium, Haloferax* y *Halococcus* engloban a las bacterias halófilas extremas. Son aeróbicas y heterotróficas. Se encuentran en salinas en las que se obtiene sal marina. El agua toma una coloración rojiza intensa debido al desarrollo masivo de las halobacterias, que contienen carotenoides (haloruberina). Su crecimiento óptimo se da a unas concentraciones de 3,5 a 5 molar. Otra característica es la capacidad de utilizar la energía luminosa para el metabolismo (apartado 12.3).

Bacterias termoacidófilas. En este grupo se reúnen provisionalmente a las arqueobacterias termófilas no metanogénicas, que entre sí tienen poco en común. Hay representantes autótrofos y heterótrofos, acidófilos extremos y neutrófilos, aeróbicos y anaeróbicos.

Sulfolobus acidocaldarius tiene su hábitat en fuentes termales ácidas y oxida el azufre a sulfato (apartado 11.2). Totalmente aislado está *Thermoplasma acidophilum*. Esta bacteria tiene en común con los micoplasmas la ausencia de una pared celular. Crece óptimamente a 59°C y pH entre 1 y 2. Su hábitat está en las escorias de carbón autocalentadas, pero también se ha encontrado en una fuente termal. Su genoma es el más pequeño encontrado entre bacterias no parasíticas ($1 \cdot 10^9$). Puede crecer aeróbica y heterotróficamente con extracto de levadura. Frente a estas especies aeróbicas se encuentra un grupo de especies anaeróbicas, que se reúnen bajo el nombre de Termoproteales. Se han aislado de fuentes termales de volcanes y del fondo del mar. Son siempre termófilos extremos (óptimo de temperatura 85-105°C) y desde el punto de vista fisiológico pertenecen al grupo que se describe como "respiradores del azufre" (apartado 9.3), esto es, oxidan H_2 y reducen el azufre elemental a sulfhídrico. Entre ellos se encuentran autótrofos facultativos (*Thermoproteus tenax*), autótrofos obligados (*Thermoproteus neutrophilus, Pyrodictium occultum*) y especies heterotróficas (*Desulfurococcus, Thermococcus, Thermodiscus*).

Con la investigación creciente de este grupo de organismos está siendo cada vez más evidente que las arqueobacterias no son sólo predecesores de las eubacterias debido a sus componentes celulares, sino que la mayoría de ellos son descendientes de aquellas bacterias primitivas que aprendieron a utilizar en los tiempos iniciales de la evolución a los dadores inorgánicos de H (H_2) y a los aceptores de H (CO_2 y azufre) disponibles, y que contribuyeron muy probablemente a los depósitos de carbono reducido de las rocas sedimentarias hace ya más de tres mil millones de años.

3.14 Bacilos curvados: espirilos y vibrios

Los espirilos y vibrios son bacterias acuáticas Gram negativas, móviles por flagelos.

Espirilos. Los espirilos se caracterizan por una apariencia celular helicoidal y por una flagelación bipolar; la obtención de energía es por respiración. Se distinguen varios géneros. El género *Spirillum* tiene una sola especie, *Spirillum volutans*. Es un espirilo gigante que se encuentra regularmente en abono de origen porcino; se ha hecho famoso por la demostración de la "volutina" (polifosfatos). En cultivo puro crece únicamente con concentraciones bajas de O_2 (aproximadamente 5%), es por tanto microaerotolerante. El número mayoritario de espirilos se incluye en el género *Aquaspirillum* (*A. itersonii, A. serpens*). En ellos también se manifiesta la tendencia a no tolerar la presión parcial de oxígeno del aire.

Vibrios. Los vibrios son anaeróbicos facultativos, y desde el punto de vista fisiológico y metabólico, semejantes a las enterobacterias (fermentación ácido mixta). El más conocido es *Vibrio cholerae*, el causante del cólera. Es transmitido por el agua; crece en el intestino y conduce a una lisis enzimática de las mucosas intestinales, y por una toxina a una pérdida enorme de agua del cuerpo.

Bdellovibrio. *Bdellovibrio bacteriovorus* es una bacteria aeróbica parásita de bacterias. Las células son relativamente pequeñas y vivamente móviles por un flagelo grueso (50 nm) (Fig. 3.12); su velocidad de desplazamiento de 100 µm/s corresponde a 70 veces la longitud del cuerpo/s. Si el parásito encuentra a una bacteria hospedadora queda fijado con el polo opuesto al del

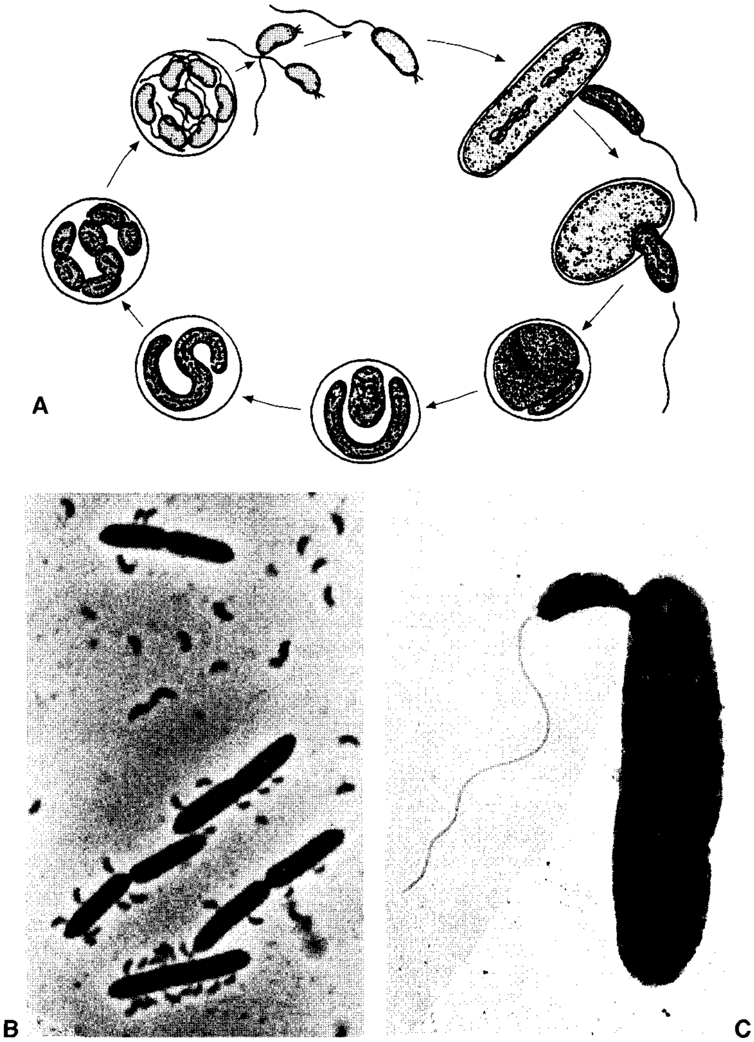


Fig. 3.12 La bacteria parásita de bacterias *Bdellovibrio bacteriovorus.* **A** Ciclo de crecimiento en la bacteria hospedadora; **B** bacterias atacadas por *Bdellovibrio* (*Erwinia carotovora*); **C** estadio inicial del ataque de una bacteria (*Pseudomonas*) por *Bdellovibrio.* Aumentos (B) 2200 veces, (C) 20 000 veces (de Stolp, H.: Naturwissenschaften 55 [1968] 57).

flagelo en la pared celular (Fig. 3.12). Ocasionalmente gira en torno a su eje longitudinal. Rápidamente la célula afectada se redondea y adquiere el aspecto de un esferoplasto. *Bdellovibrio* atraviesa la pared celular y se instala en el espacio periplásmico. La célula de *Bdellovibrio* crece hasta formar un largo bacilo, hasta el momento en que se agoten los nutrientes captados del protoplasto, que a su vez se va contrayendo paulatinamente. El bacilo sufre una división múltiple, formándose células de tamaño uniforme; por último, se destruye la pared celular del hospedador, se libera la descendencia y ya pueden infectar nuevas bacterias. La infección progresiva y la lisis de bacterias se ponen de manifiesto en un cultivo continuo de bacterias en una placa por la formación de zonas de lisis o calvas, y en suspensiones por la disminución macroscópicamente visible de turbidez. A diferencia de los bacteriófagos, que sólo se reproducen en bacterias en crecimiento, *Bdellovibrio* también lo hace sobre células que no estén en crecimiento. Las cepas de *Bdellovibrio* aisladas hasta ahora de los suelos se diferencian por su espectro de huéspedes. Lisan preferentemente a bacterias Gram negativas, sobre todo pseudomonas y enterobacterias. Mientras que el tipo salvaje es un parásito obligado de bacterias, que necesita como alimento, existen algunos mutantes capaces de desarrollarse sobre medios complejos mediante una alimentación saprofítica, esto es, sin necesidad de células bacterianas. Existe la tendencia a aceptar que la forma parasitaria de vida de *Bdellovibrio* representa una adaptación a un ambiente pobre en nutrientes.

Vibrios anaeróbicos estrictos. Un segundo grupo de bacterias con forma de vibrio es anaeróbico estricto: *Desulfovibrio*, *Selenomonas*, *Butyrivibrio* y *Succinivibrio*. *Desulfovibrio* representa el tipo metabólico de los desulfuricantes (pág. 343). *Selenomonas sputigena* está en la cavidad bucal (en el sarro dental) del hombre y *S. ruminantium* es una bacteria de la panza. Las dos especies se caracterizan por su flagelación lateral, y crecen por fermentación de hidratos de carbono a propionato y acetato.

3.15 Espiroquetas

Las espiroquetas constituyen un grupo de bacterias unicelulares quimioorganotrofas de una morfología muy característica. Se diferencian de todas las demás bacterias por su constitución celular y por su modo de movimiento. La morfología es espiralada, como la de un espirilo; no obstante, el cuerpo celular no es rígido, sino extraordinariamente flexible. En comparación con su longitud (5-500 µm) su diámetro es extraordinariamente estrecho (0,1-0,6 µm). Por ello atraviesan los filtros de poro estrecho (0,2-0,45 µm), que retienen a la mayoría de bacterias, y pueden enriquecerse por filtración. Debido a su escaso diámetro son difíciles de observar al microscopio de campo claro y hay que recurrir al microscopio de contraste de fases y al de campo oscuro.

Estructura celular. En la célula de las espiroquetas pueden diferenciarse tres componentes principales: el cilindro protoplasmático, las fibrillas axiales y la membrana o vaina externa (Fig. 3.13). El cilindro protoplasmático arrollado en espiral está delimitado hacia fuera por el complejo membrana citoplasmática-pared celular. A su alrededor se enrollan fibri-

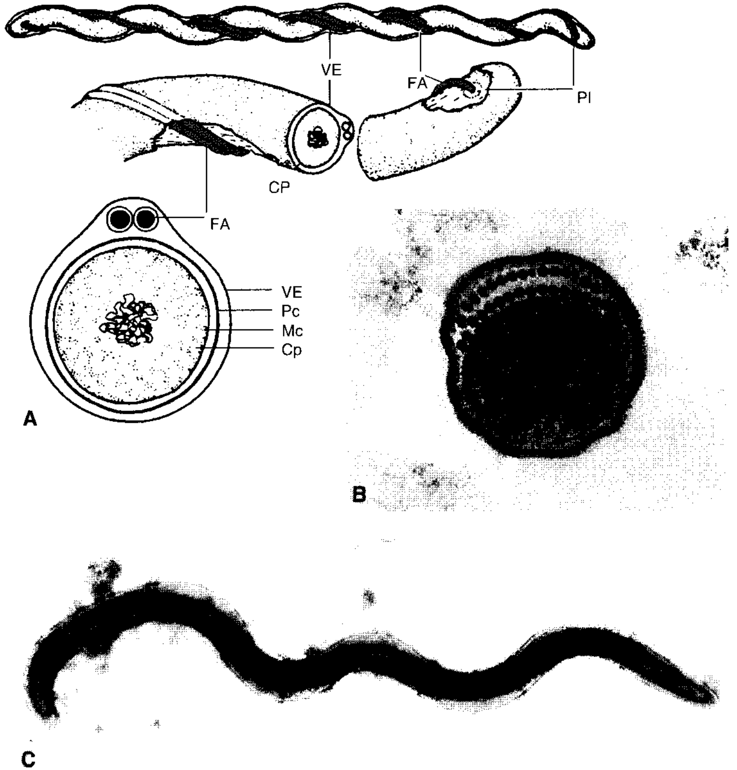


Fig. 3.13 La célula de las espiroquetas. A El cilindro protoplasmático (CP) está rodeado por un filamento axial, que aquí consta de dos fibrillas axiales (FA) cada una de las cuales se inserta en un extremo del cilindro protoplasmático (PI = poro de inserción). Las fibrillas se superponen. El filamento axial y el cilindro protoplasmático están envueltos por una membrana (vaina externa, VE). Pc = pared celular, Mc = membrana citoplasmática, Cp = citoplasma (según Holt, S.C.: Microbiol. Rev. 42 [1978] 114). Micrografías electrónicas de una sección **B** y en estado alargado **C** de una espiroqueta bucal con varias fibrillas axiales; Aumentos (B) 110 000, (C) 7000 (de Listgarten, H.: J. Bacteriol. 88 [1964] 1087).

llas que se denominan fibrillas axiales, o en su conjunto como filamento axial. Cada fibrilla se fija por un extremo en las cercanías del polo celular y el otro extremo queda libre. El número de fibrillas es distinto de una especie a otra: en *Treponema pallidum* y *Leptospira* generalmente 4, en *Borrelia* hasta 18 y en *Cristispira* más de 100. En cada extremo se inserta aproximadamente el mismo número de fibrillas; las fibrillas se superponen en el centro o a lo largo de toda la célula. La vaina externa recubre al cilindro protoplasmático y a las fibrillas.

Tipo de movimiento. Aunque las espiroquetas no disponen de flagelos tienen la capacidad de desplazarse sin contacto con superficies sólidas y de reptar sobre superficies. Muy probablemente las fibrillas están implicadas en el movimiento. Las fibrillas tienen en común con los flagelos la naturaleza proteica (flagelina), el tipo de inserción en el soma celular y la ordenación helicoidal de las subunidades. Los resultados de los experimentos hacen suponer que las fibrillas, por rotación y contracción, determinan el tipo característico de movimiento de las espiroquetas, que se describe como torsión, serpentear o flexión brusca.

Distribución, hábitats y representantes más importantes. Las espiroquetas de vida libre se encuentran en muchos hábitats acuáticos (lagos, lagunas y en el mar). Otras pertenecen a la microflora normal autóctona de animales. Están en el intestino de mamíferos, en la superficie de ciliados, en el intestino de termitas y cucarachas xilófagas, en el cristalino de moluscos, en la panza y en otros hábitats. Sólo pocas son patógenas (sífilis, fiebres recurrentes, leptospirosis).

Se distinguen cinco géneros: *Spirochaeta*, *Cristispira*, *Treponema*, *Borrelia* y *Leptospira*.

Spirochaeta plicatilis se distribuye regularmente en el sedimento de aguas dulces y saladas. No está nunca en los lodos activos, pero siempre en zonas mesosaprobias de las aguas, en estanques y charcos, en el lodo, en los que también se encuentran bacterias rojas fotosintéticas en cantidades masivas. Se pone de manifiesto por su movimiento característico constante. En el laboratorio sólo se mantiene durante poco tiempo. *Spirochaeta zuelzerae* se encuentra en los lodos de las aguas. Es anaeróbica estricta, crece en un medio de cultivo con extracto de levadura y glucosa, y utiliza toda una serie de azúcares y almidón. Crece a una temperatura óptima de 37 a 40°C, y es muy semejante a *Treponema pallidum*, tanto morfológicamente como en su estructura antigénica; da una reacción de fijación del complemento positiva con suero antisífilis. *S. zuelzerae*, lo mismo que espiroquetas de la panza, fermentan la glucosa a lactato, acetato, succinato, anhídrido carbónico e hidrógeno molecular: desde el punto de vista del tipo fermentativo son semejantes a *Escherichia coli*.

Cristispira habita en el cristalino y en el canal estómaco-intestinal de moluscos de agua dulce y salada (*Anodonta*; *Pecten*, *Venus*, entre otros). Las vueltas de la espiral son más acusadas que en *Spirochaeta plicatilis*; el diámetro del cuerpo es de 0,5-3 µm; sobre él se encuentra una orla fina que se enrosca alrededor del cuerpo. En su ordenación, esta orla se corresponde con la cresta, el filamento axial. Está compuesto por más de 100 fibrillas individuales.

A las Treponematáceas pertenecen las formas menores de las espiroquetas. *Treponema pallidum* es el causante de la sífilis y *T. pertenue* de la frambuesa tropical. Otros treponemas son parásitos relativamente inocuos de la cavidad bucal; *T. macrodentium* se aísla fácilmente de la saliva y el sarro dental.

En el género *Borrelia* se cuentan las espiroquetas anaeróbicas fácilmente coloreables con anilinas. Son parásitos de distintos artrópodos y causantes de enfermedades en el hombre y otros vertebrados ("espiroquetas de la sangre"). *B. recurrentis* es el causante de las fiebres recurrentes. Con *B. anserina* controlaron EHRLICH y HATA los preparados de arsénico contra la sífilis, hasta que con el salvarsán se consiguió un quimioterapéutico de alta eficacia. *B. burgdorferi* es el causante de la enfermedad de Lyme, una borreliosis. La transmiten las garrapatas, que a su vez se diseminan por ciervos y aves. La infección se combate fácilmente con antibióticos.

Al género *Leptospira* pertenecen las espiroquetas aeróbicas más pequeñas; tienen un grosor de 0,1-0,25 µm y una longitud de 4-8 µm. Característicos son los extremos en forma de gancho. *L. biflexa* se puede aislar de aguas dulces (aguas de conducciones, estanques y charcos), crece sobre medios de cultivo normales y es aeróbico. Entre las patógenas se cuenta *L. icterohaemorrhagiae*, el causante de la "enfermedad de Weil", *L. pomona* causante de la enfermedad de los porqueros, y *L. canicola* causante de la "ictericia infecciosa". Se ingieren con el agua o los alimentos, llegan a la sangre, los riñones o el hígado, y causan disfunciones en dichos órganos, que tienen como consecuencia hemorragias e ictericia.

3.16 Bacterias con movimiento deslizante

La capacidad de desplazarse por deslizamiento o reptación la tienen pocas bacterias. Se reúnen con el nombre de bacterias deslizantes. A él pertenecen:

(I) bacterias que depositan intracelularmente gránulos de azufre, entre las que hay formadoras de tricomas (*Beggiatoa*, *Thiothrix*) y formas unicelulares (*Achromatium*);

(II) bacterias que forman tricomas y no almacenan azufre, como *Vitreoscilla*, *Leucothrix* y *Saprospira*, así como las "oscilatorias bucales", *Simonsiella* y *Alysiella* (Fig. 3.14);

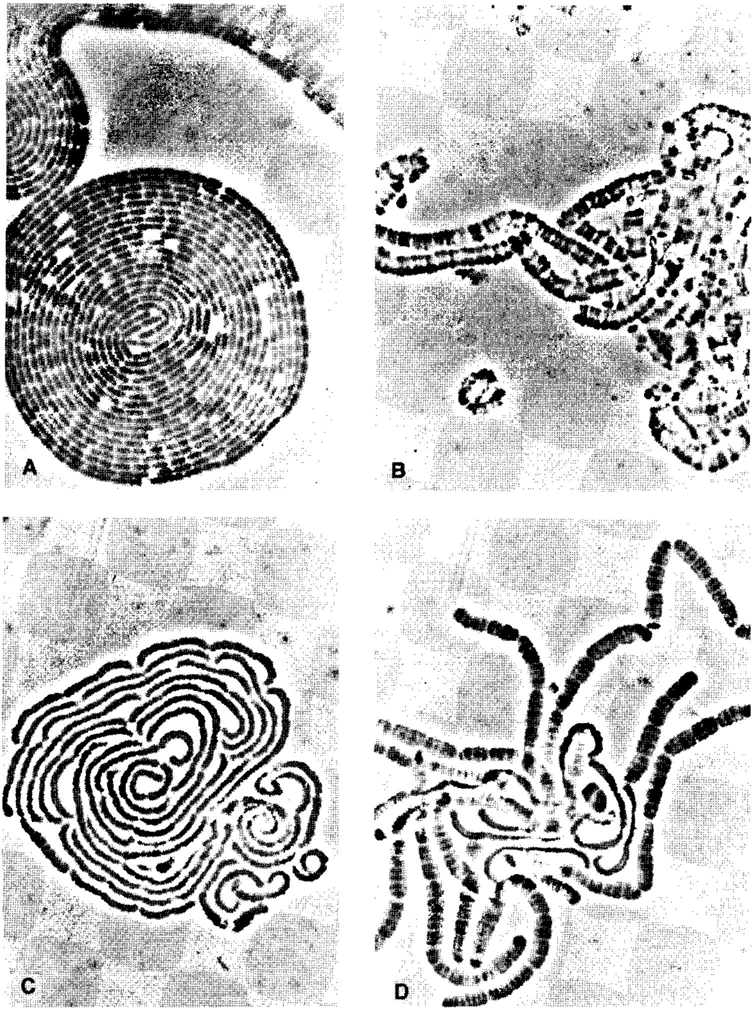


Fig. 3.14 Bacterias formadoras de filamentos. A Colonia de *Vitreoscilla* spec.; **B** *Alysiella filiformis*; **C** colonia de *Simonsiella crassa* antes de iniciar el deslizamiento; **D** *S. crassa*, filamentos planos y de lado, algunos deslizándose; fotos en campo claro (de V.B.D. Skerman).

(III) bacterias bacilares unicelulares, a las que pertenecen las mixobacterias, el grupo *Cytophaga* y el grupo *Flexibacter*;
(IV) la bacteria filamentosa *Chloroflexus*, también móvil por deslizamiento, se trata entre las bacterias fototróficas anoxigénicas (apartado 12.1);
(V) las cianobacterias, caso de ser móviles, lo hacen también por deslizamiento. Se describen en el apartado 3.21.

(I). *Beggiatoa* es una bacteria del azufre filamentosa e incolora. Consta de tricomas de grosor uniforme, de constitución muy semejante a *Oscillatoria*. Por el diámetro del filamento (1,5-35 μm) se distinguen varias especies. Las células contienen normalmente gránulos de azufre; por ello el filamento incoloro aparece blanco. Los filamentos son móviles por deslizamiento. *Beggiatoa* es aeróbica y aparece en masas como una cubierta en tela de araña por encima del lodo de las aguas lentas o en el mar, allí donde el agua conteniendo sulfhídrico entra en contacto con el oxígeno del aire. El sulfuro es oxidado a sulfato; como producto intermediario puede almacenarse transitoriamente azufre elemental. En la investigación de *Beggiatoa* desarrolló WINOGRADSKY (1888) el concepto del metabolismo quimiolitotrófico autotrófico: obtención de energía por oxidación de compuestos inorgánicos reducidos, asociada a la síntesis de material celular por fijación de anhídrido carbónico. Entre las cepas de *Beggiatoa* distribuidas en la naturaleza existen algunas que requieren nutrientes orgánicos.

Thiothrix no puede moverse libremente. Los tricomas forman unos penachos con su base fija a un sustrato; el tricoma tiene una base y una punta y se estrecha de 5 a 2 μm. La reproducción es por gonidios, que se forman por redondeamiento de células apicales, y que en superficies sólidas muestran un movimiento por deslizamiento. La mayoría de las veces se fijan varios gonidios conjuntamente y crecen formando filamentos pluricelulares. *Thiothrix* está significativamente más extendido que *Beggiatoa* y crece en todas las aguas donde se descompone materia orgánica con formación de sulfhídrico.

(II). *Vitreoscilla* es una bacteria filamentosa pluricelular, incolora y aeróbica que se mueve por deslizamiento y se reproduce por rotura de los filamentos (Fig. 3.14). Puede aislarse de excrementos de vaca. *Leucothrix* crece de forma epifita sobre algas marinas, y por su forma de crecimiento representa el oponente organotrófico de *Thiothrix*. Los filamentos crecen generalmente formando penachos, fijándose con sus bases a una superficie sólida.

Frente a la cianobacteria *Spirulina* arrollada en espiral, pueden situarse la bacteria del azufre *Thiospirillopsis floridana* y la organotrófica *Saprospira grandis*, de igual conformación.

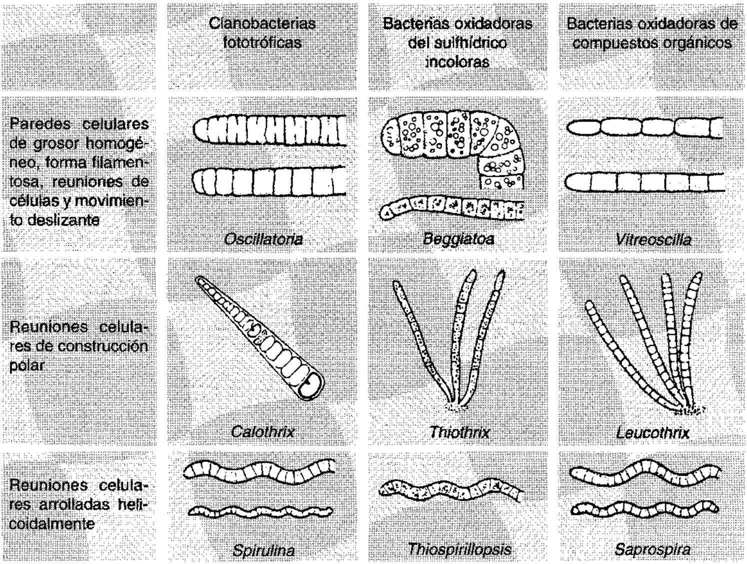

Cianobacterias fototróficas
Bacterias oxidadoras del sulfhídrico incoloras
Bacterias oxidadoras de compuestos orgánicos
Paredes celulares de grosor homogéneo, forma filamentosa, reuniones de células y movimiento deslizante
Oscillatoria
Beggiatoa
Vitreoscilla
Reuniones celulares de construcción polar
Calothrix
Thiothrix
Leucothrix
Reuniones celulares arrolladas helicoidalmente
Spirulina
Thiospirillopsis
Saprospira

Fig. 3.15 Comparación de algunas cianobacterias con algunas bacterias no fototróficas morfológicamente relacionadas.

En la figura 3.15 se indican esquemáticamente los representantes típicos morfológicamente semejantes de los tres tipos fisiológicos (cianobacterias fototróficas; bacterias incoloras oxidadoras del sulfhídrico; bacterias oxidadoras de compuestos orgánicos), y se han ordenado de forma que queden juntas las morfologías semejantes.

(III). Entre las **mixobacterias** se cuentan representantes de las bacterias quimioheterotróficas, aeróbicas estrictas, que se mueven por deslizamiento. Son bacterias del suelo, y en la naturaleza llaman la atención por la formación de cuerpos fructíferos, aunque éstos sean muy pequeños (tamaño inferior a 1 mm). Se encuentran cuerpos fructíferos de este tipo sobre materiales vegetales en descomposición, como por ejemplo, madera en descomposición, cortezas de árboles y también en excrementos de animales herbívoros. Pueden aislarse de estos últimos (por ejemplo, excrementos de ratones o conejos) después de incubarlos algunas semanas en tierra húmeda.

Sobre medios de cultivo sólidos las mixobacterias forman colonias planas, muy extendidas. Cuando las células vegetativas se reúnen en varios lugares en el interior de la colonia, se diferencian cuerpos fructíferos, que son

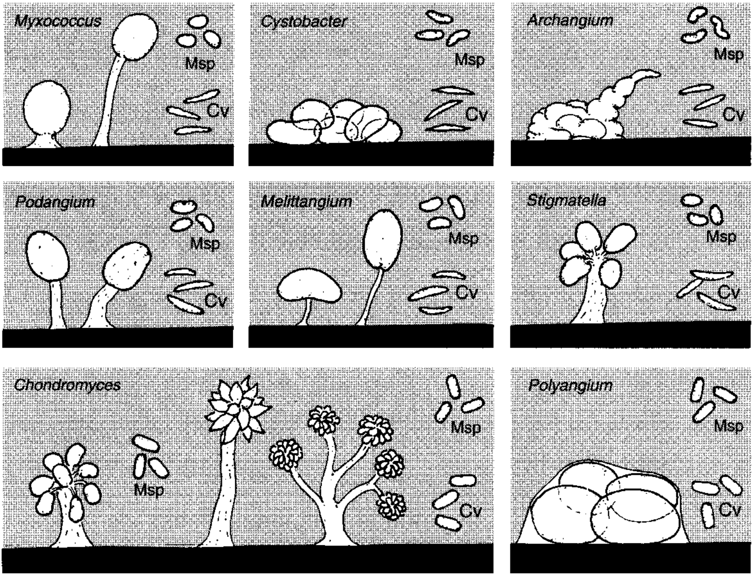

Myxococcus
Msp
Cv
Cystobacter
Msp
Cv
Archangium
Msp
Cv
Podangium
Msp
Cv
Melittangium
Msp
Cv
Stigmatella
Msp
Cv
Chondromyces
Msp
Msp
Cv
Polyangium
Msp
Cv

Fig. 3.16 Cuerpos fructíferos y formas de las mixósporas y células vegetativas de algunas mixobacterias. Los cuerpos fructíferos se han dibujado esquemáticamente y no a la misma escala. Las células vegetativas de las dos hileras superiores de géneros tienen forma de huso (bacilos con extremos puntiagudos), las de *Chondromyces* y *Polyangium* son bacilares con extremos romos. Abreviaturas: Msp = mixósporas; Cv = células vegetativas (según REICHENBACH, H.: Biologie in unserer Zeit 4 [1974] 33).

distintos en forma, tamaño y pigmentación. A través de ellos se distinguen los géneros y especies (véanse Figs. 3.16 y 3.17). Durante el proceso de maduración, las células se transforman en el interior del cuerpo fructífero en células en reposo, es decir, en mixósporas. Las mixósporas pueden tener forma esférica (*Myxococcus*) o bacilar (véase Fig. 3.16), y estar incluidas en un cisto.

Desde el punto de vista de su nutrición se diferencian especies bacteriolíticas y celulolíticas. La mayoría de las mixobacterias son capaces de lisar bacterias con ayuda de exoenzimas. Sólo el género *Polyangium* tiene especies celulolíticas.

En el **grupo *Cytophaga*** se incluyen los géneros *Cytophaga* y *Sporocytophaga*, caracterizados por su capacidad de descomponer aeróbicamente celulosa en los suelos. Tienen en común con las mixobacterias la capacidad de moverse por deslizamiento, pero no forman cuerpos fructíferos. Algunas especies son anaeróbicas facultativas y fermentan la glucosa con formación de ácidos orgánicos.

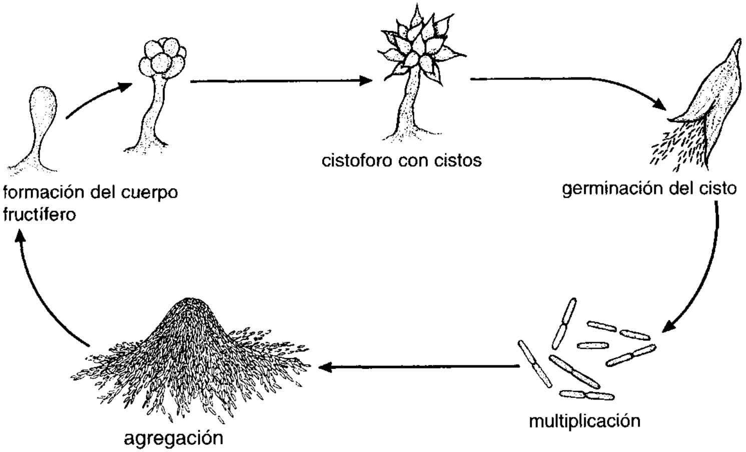

formación del cuerpo fructífero
cistoforo con cistos
germinación del cisto
multiplicación
agregación

Fig. 3.17 Ciclo de desarrollo con formación de cuerpo fructífero de *Chondromyces apiculatus*. Después de la agregación de las células tiene lugar la formación de un cuerpo fructífero compuesto por un pedúnculo limoso y cistos. Los cistos son órganos de dispersión que liberan a las mixósporas en su germinación, las cuales se transforman a su vez en células vegetativas.

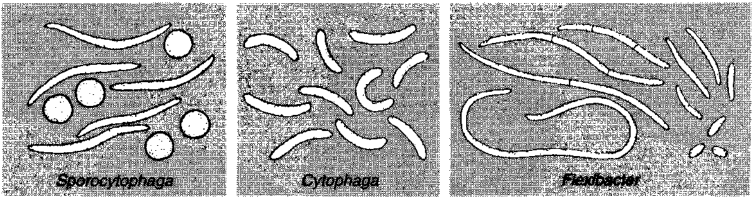

Sporocytophaga
Cytophaga
Flexibacter

Fig. 3.18 Formas celulares de los géneros *Sporocytophaga*, *Cytophaga* y *Flexibacter*. *Flexibacter* forma en cultivos jóvenes bastantes células de 100 µm de largo que casi no están divididas por paredes transversales, y que se mueven activamente; si se incuban durante más tiempo las células filamentosas se descomponen en células más cortas y finalmente cocoidales (según REICHENBACH, H.: Biologie in unserer Zeit 4 [1974] 33).

En el caso de *Sporocytophaga* las células vegetativas en forma de huso pueden transformarse en células encapsuladas de persistencia, semejantes a las mixósporas de *Myxococcus* (Fig. 3.18), pero que aquí se denominan microcistos. *Cytophaga* y *Sporocytophaga* pueden enriquecerse fácilmente sobre celulosa (papel de filtro) (pág. 457).

Las **especies de *Flexibacter*** son bacterias acuáticas. Están constituidas por células muy flexibles, largas y no subdivididas (Fig. 3.18), que al aumentar el tiempo de cultivo se transforman en filamentos más cortos y por último en células cocoidales. Muchas formas contienen carotenoides y son amarillas, rosas o anaranjadas. En el género *Flexibacter* se cuenta recientemente también al causante de la enfermedad de Columnaris de los peces, *F. columnaris* (*Chondrococcus columnaris*).

3.17 Bacterias con apéndices y con yemas

Bajo este título se reúnen bacterias que se diferencian en su aspecto de las bacterias "normales": bien por apéndices, prolongaciones de tipo hifa, por pedúnculos o por masas limosas (Fig. 3.19 y 3.20).

Bacterias con yemas y prostecadas. Por gemación se entiende el tipo de reproducción celular característica de las levaduras gemantes. A diferencia de la división binaria, la gemación es una división celular desigual y se realiza por un crecimiento local. La célula hija (yema) es casi siempre más pequeña que la célula madre y alcanza el tamaño normal frecuentemente después de su independencia. A las bacterias gemantes pertenecen bacterias

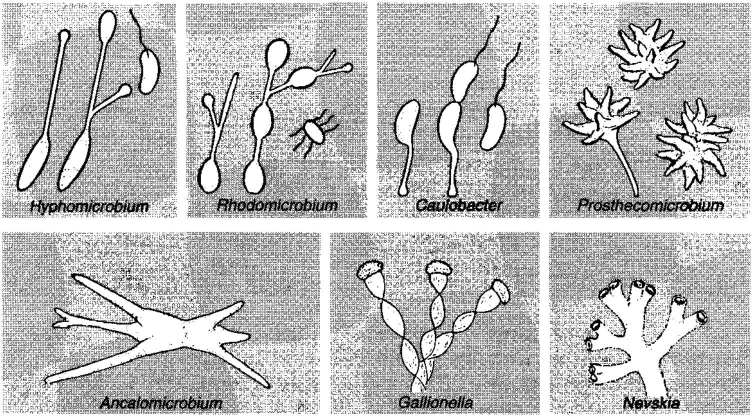


Fig. 3.19 Bacterias prostecadas y pedunculadas.

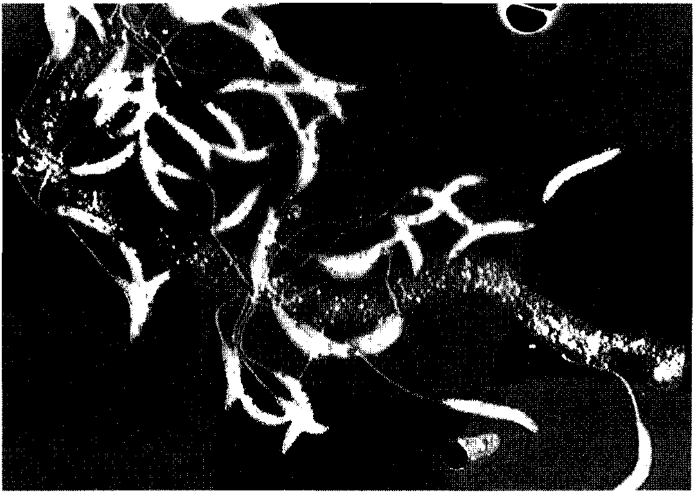


Fig. 3.20 ***Caulobacter*** **sobre células muertas de** ***Bacillus megaterium*****.** Micrografías electrónicas (aprox. 4000 veces) después de un sombreado metálico (Fotografía A.L. HOUWINK).

de aguas y de suelos. *Hyphomicrobium vulgare*, que puede enriquecerse como bacteria desnitrificante en un medio que contenga metanol y nitrato, se encuentra regularmente en las aguas estancadas y también en los baños de agua de los laboratorios; forma las yemas en las hifas largas. Un hábitat semejante presenta la bacteria roja fototrofa *Rhodomicrobium vannielii*.

Los apéndices y pedúnculos de las bacterias se denominan prostecas (apéndices en griego). Las bacterias prostecadas son bacterias que tienen apéndices. Las más conocidas son bacterias del grupo de *Caulobacter* (*Caulobacter vibrioides*, *Asticcacaulis*) que igualmente se encuentran en las películas superficiales de los baños de agua. Tienen una forma característica y realizan un ciclo vital complejo.

Los bacilos de flagelación polar se fijan con el polo del flagelo sobre superficies firmes o sobre otras bacterias. A continuación el polo del flagelo se convierte en un pedúnculo; la célula se divide normalmente y la célula hija adquiere un flagelo en el polo libre.

Mediante una investigación cuidadosa de la superficie de crustáceos, plantas acuáticas y de los seres vivos de la superficie acuática, el neuston, se han encontrado otras bacterias de apariencia curiosa, como *Prosthecomicrobium*, *Ancalomicrobium* y *Pedomicrobium*.

Bacterias "pedunculadas". Algunas bacterias muy extendidas disponen de pedúnculos, formados por limos. *Gallionella ferruginea* es una célula en forma de haba. En la parte cóncava excreta un limo en forma de delgadas fibrillas, que al microscopio se reconoce bien como un filamento arrollado en espiral incrustado de óxido de hierro. *Gallionella* es la bacteria del hierro más conocida, de crecimiento masivo en aguas ferrosas (arroyos, conducciones de drenaje), sobre todo en primavera.

Nevskia ramosa se ha aislado varias veces de la película superficial de lagunas, fosas de pantanos y baños de agua. La excreción polar de limos, característica, parece tener lugar tan sólo cuando hay carencia de nutrientes.

3.18 Bacterias parásitas obligadas de células

El que algunas bacterias requieran para su multiplicación a otras células vivas ya se ha mencionado anteriomente (pág. 117) en el ejemplo de *Bdellovibrio bacteriovorus.* Probablemente muchas de las bacterias que se presentan como endosimbiontes de insectos o ciliados están estrictamente unidas a su hábitat. La causa del modo de vida parasitario estricto puede interpretarse por lo general como una degeneración del metabolismo. Entre las bacterias intracelulares obligadas mejor investigadas se encuentran las rickettsias y las clamidias. Ambas son causantes de enfermedades en hombres y en animales. La estructura de su pared celular es Gram negativa en ambos casos.

Rickettsias. Las rickettsias se denominaron en honor a H.T. RICKETTS, el descubridor de la fiebre de las montañas Rocosas americanas. Debido a la enfermedad provocada por el agente mejor investigado (*Rickettsia prowazekii*) se habla también del grupo del tifus exantemático. Su distribución natural es en artrópodos (garrapatas, ácaros, pulgas, piojos) en los que parecen vivir como parásitos inofensivos o incluso como simbiontes. Si llegan a otra especie animal hospedadora o al hombre por mordedura, arañazo o inhalación se desencadenan graves síntomas clínicos.

A pesar de que las rickettsias tienen un tamaño aproximadamente igual al de algunos virus poliédricos son claramente diferenciables de los virus. Contienen tanto DNA como RNA en la relación 1:3,5. Las células están rodeadas por una pared celular, con ácido murámico, que es sensible a la *lisozima.* En las imágenes al microscopio electrónico de cortes finos de tejidos se reconoce una región nuclear y una pared celular.

La mayoría de las rickettsias no se han cultivado nunca fuera de células vivas, pero pueden reproducirse en huevos de gallina y en animales: de la yema de un huevo pueden obtenerse 10^9 células. En las células aisladas pueden demostrarse algunos enzimas del metabolismo intermediario. A lo largo del almacenamiento desciende la actividad metabólica de las células; si se añaden ATP, ácidos orgánicos y aminoácidos vuelve a funcionar la respiración. Por tanto, las rickettsias desarrollan un metabolismo propio, pero al parecer por características modificadas de la permeabilidad de las superficies externas son incapaces de controlar la entrada o salida de los metabolitos.

Los patógenos más conocidos dentro de las rickettsias pertenecen al grupo del tifus exantemático. *R. prowazekii* es el causante del tifus exantemático epidémico. El reservorio es el hombre. El agente causal es transmitido por el piojo (de la ropa o del pelo). Los piojos mueren por su causa en pocos días. La infección tiene lugar a través de los excrementos del piojo. *R. typhi* es el causante del tifus exantemático endémico o murino, que presenta un cuadro clínico semejante, pero más atenuado. El agente causal está extendido entre las ratas; éstas se mantienen sin síntomas. Se transmiten de rata a rata por pulgas de rata, y de vez en cuando pasan al hombre.

Mientras que las rickettsias mencionadas son relativamente sensibles a la desecación y al calentamiento, el agente causal de la fiebre Q, *Coxiella burnetti*, sobrevive también fuera de sus hospedadores. Se transmite a corderos, cabras y vacas por garrapatas, y no sólo llegan al hombre por mordedura de garrapatas, sino también por polvo de la lana o de la piel, de suelos infectados y por la leche. Incluso una pasteurización normal de la leche (60°C, 30 min) no mata a *Coxiella.*

Clamidias. Las clamidias son conocidas como causantes de enfermedades en el hombre. *Chlamydia trachomatis* es el causante del tracoma, enfermedad de la córnea o enfermedad ocular egipcia, que se inicia con una conjuntivitis y que conduce a la ceguera, y una enfermedad venérea, el linfogranuloma venéreo. En ambos casos el agente causal se transmite por contacto. *Chlamydia psittaci* provoca ornitosis, entre ellas la psitacosis (enfermedad de papagayos), una inflamación pulmonar acompañada de fiebre, que es la más conocida; los hospedadores principales del agente son los pájaros.

Que las clamidias sean bacterias y no virus, tal como se consideró anteriormente, se ha establecido mediante caracteres bioquímicos. Contienen RNA y DNA en la relación característica para las bacterias y sintetizan sustancias que no pueden sintetizar las células eucariotas del hospedador, por ejemplo, ácido murámico, ácido diaminopimélico, D-alanina y ácido fólico. Con estas características está de acuerdo su sensibilidad frente a la penicilina y a las sulfonamidas. Su genoma es pequeño (peso relativo $0{,}66 \times 10^9$): contiene por tanto sólo un cuarto de la información genética comparado con *Escherichia coli.*

Las clamidias crecen únicamente en células vivas y se cultivan en huevos de gallina o en cultivos de tejidos. La dependencia con respecto al metabolismo de la célula hospedadora parece deberse a la falta de un sistema de regeneración de ATP. No pueden fosforilar ni descomponer la glucosa. Por otra parte, son extraordinariamente permeables al ATP y al Coenzima A. Pueden considerarse por ello como "parásitos energéticos".

Las bacterias parásitas intracelulares estrictas son aparentemente el resultado de una evolución regresiva. La adaptación a la célula hospedadora ha ido paralela a una pérdida de las capacidades sintéticas.

3.19 Grupo de *Mycoplasma*

Los pertenecientes al grupo de *Mycoplasma* (clase Mollicutes) son los procariotas más pequeños capaces de reproducirse independientemente. No poseen pared celular. Como el protoplasto sólo está delimitado hacia fuera por la membrana citoplasmática las células son osmóticamente extraordinariamente sensibles. El tamaño del genoma de la mayoría de los mycoplasmas (*Mycoplasma* y *Ureaplasma*) es sólo una fracción del de *Escherichia coli*. Con una masa de tan sólo 500-900 kb tienen el genoma menor entre los procariotas capaces de división independiente. Por ello, se ha elevado el orden mycoplasmatales a una clase propia con la denominación de **Mollicutes** (piel blanda) y se expresa así la diferenciación filogenética de este grupo con respecto a todas las demás bacterias.

El primer representante del grupo de los mycoplasmas que se describió es el causante de la pleuroneumonía, una neumonía bovina. Crece en medios de cultivo con agar que contengan suero formando colonias pequeñas en forma de huevo frito; las formas de crecimiento semejante se han denominado por ello PPLO (**p**leuro**p**neumonia-**l**ike **o**rganisms). Se vio que los mycoplasmas son causantes de otras muchas enfermedades, contaminantes de cultivos de tejidos y también parásitos inocuos.

Las colonias están formadas por células y partículas de diferente tamaño, que se describen como células cocoidales, filamentos, discos y rosetas. Se multiplican por división binaria, por rotura de filamentos y anillos en células cocoidales y por procesos semejantes a la gemación. En medios de cultivo líquidos también aparecen formas muy irregulares y también frecuentemente formas ramificadas (Fig. 3.21) que al igual que los virus pasan a través de los filtros de membrana.

Distribución y especies. Los pertenecientes al grupo de *Mycoplasma* (género *Mycoplasma*, *Acholeplasma* y *Spiroplasma*) son bacterias parásitas. No obstante, no matan a su hospedador, sino que más bien provocan infecciones crónicas, y son por tanto parásitos muy efectivos.

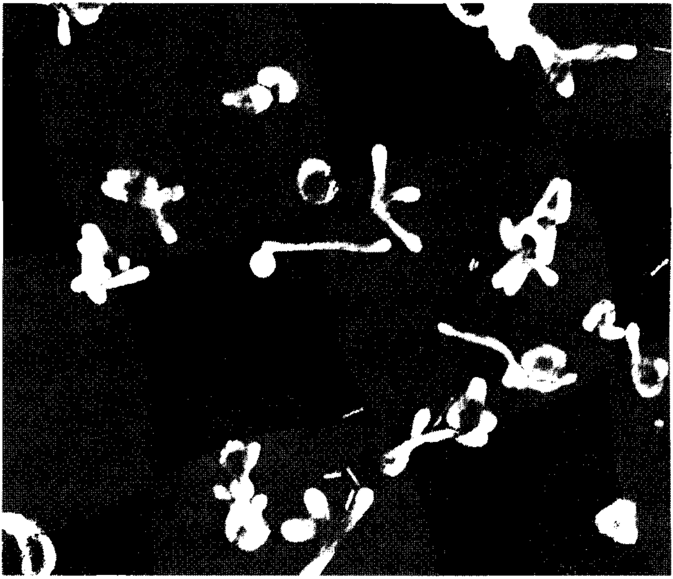


Fig. 3.21 Mycoplasmas. Células del causante de la bronconeumonía de la rata crecidas en cultivo líquido; micrografía electrónica; aumentos 11 200 (de KLIENEBERGER-NOBEL, E., F.W. CUCHOW: J. gen. Microbiol. 12 [1955] 95).

En los animales se encuentran aparentemente como parásitos inocuos en las serosas de las vías respiratorias y del aparato genital (mamíferos y aves). Son parásitos de las membranas, esto es, se fijan fuertemente a las células epiteliales de las serosas. No excretan ninguna toxina, pero a través del contacto íntimo de las células sin pared con las células del hospedador algunos productos metabólicos débilmente tóxicos, como los iones amonio y el peróxido de hidrógeno, ya actúan como tóxicos sobre las membranas de las células del hospedador.

Se diferencian dos géneros de mycoplasmas parásitos de animales. Los pertenecientes al género *Mycoplasma* necesitan para crecer en cultivo axénico colesterina o aditivos complejos del medio de cultivo que contengan esteroides (suero sanguíneo). Para las especies que no requieren colesterina se ha creado el género *Acholeplasma*. Mientras la infección con mycoplasmas no presenta síntomas en algunos animales, en otros lleva a la inflamación de las vías respiratorias, de los pulmones o de las ubres. La especificidad en cuanto al hospedador se pone de manifiesto en los nombres específicos, como *Mycoplasma canis*, *M. gallisepticum*, *M. hominis* entre otros.

En las plantas los mycoplasmas son los causantes de enfermedades de amarilleamiento. Se localizan preferentemente en el floema de los vasos conductores, y por su semejanza morfológica con *Spirillum* se reúnen en el genero *Spiroplasma*. *Spiroplasma citri* es el causante del amarilleamiento de limoneros. Otras formas semejantes se han demostrado en otros vegetales (maíz, opuntias, arroz). *Spiroplasma* se ha encontrado también en abejas y saltamontes, y se cree que los insectos no son sólo transmisores, sino también hospedadores de especies de *Spiroplasma*.

Características bioquímicas. El grupo de *Mycoplasma* se destaca no sólo por la ausencia de pared celular, sino también por las características bioquímicas diferentes de la mayoría de las otras bacterias. Sólo crecen en medios de cultivo isotónicos o hipertónicos (con sorbitol o sacarosa) y requieren purinas, pirimidinas y lípidos, entre ellos esteroides. La ausencia de quinonas y citocromos permite concluir la existencia de una cadena respiratoria limitada.

Relación con las formas L. De una población de células de *Streptobacillus moniliformis* se aisló en 1934 una cepa que se reproducía en forma de protoplastos irregulares. Estas formas se denominaron formas L, por el Instituto Lister. De *Salmonella*, *Escherichia*, *Proteus* y otras bacterias pueden también aislarse células en crecimiento como protoplastos desnudos, cuando se cultivan sobre agar sangre en presencia de penicilina (100 μg/ml). Crecen colonias en forma de "huevo frito", muy semejantes a las de las especies de *Mycoplasma*. Se han aislado dos tipos de formas L: formas L lábiles, que en ausencia de penicilina revierten a las formas normales con pared celular, y las formas L estables, que sin penicilina tampoco forman ninguna pared celular. Al principio se consideró que las especies de *Mycoplasma* resultaban a partir de bacterias normales por mutación a formas L estables; el tamaño del genoma y el contenido en GC contradicen no obstante su origen a partir de eubacterias y demuestran que se trata de una clase bacteriana separada.

3.20 Bacterias fototróficas, anaeróbicas, anoxigénicas

Las bacterias fototróficas anaeróbicas (rodospirilales) se caracterizan por disponer de pigmentos fotosintéticos y tener la luz como fuente energética. En base a distintas características fisiológicas esenciales se distinguen **cuatro familias**: bacterias rojas del azufre (Cromatiáceas), bacterias rojas sin azufre (Rodospiriláceas), bacterias verdes del azufre (Clorobiáceas) y el grupo de *Chloroflexus* (Clorofexáceas). Se trata de un grupo filogenético natural. Se tratará en relación con la fotosíntesis (Cap. 12).

3.21 Bacterias fototróficas, aeróbicas, oxigénicas: cianobacterias

Debido a su tipo de división celular, la división binaria, se había clasificado ya desde hace tiempo a las cianobacterias junto a las bacterias, dentro de los esquizófitos. No obstante, debido a características fisiológicas comunes se las consideraba junto a los vegetales y se las denominaba cianofíceas. Por ello se utilizaba el código sistemático de los botánicos. Se incluye a las cianobacterias dentro de las bacterias desde que se puede distinguir claramente entre procariotas y eucariotas.

Las cianobacterias tienen en común con las algas y las plantas superiores una fotosíntesis que conlleva una producción de oxígeno, así como el poseer clorofila a y otros pigmentos, y por ello se clasificaron como algas verde-azules o cianofíceas. No obstante, ya F. COHN por su mecanismo de división celular las llamó Esquizofíceas y las reunió con los esquizomicetos (bacterias actuales) en los esquizófitos. De hecho, por su estructura celular, la pared celular de mureína, los ribosomas 70S y otras características decisivas, se trata de procariotas Gram negativos. Las cianobacterias son el grupo mayor, más rico en formas y más extendido de procariotas fotosintéticamente activos. Son de gran importancia en la economía de la naturaleza por poder desarrollarse en hábitats extremos y fijar el nitrógeno molecular.

Algunas cianobacterias son móviles. El movimiento no se da nunca mediante flagelos sino por **deslizamiento** o reptación sobre superficies sólidas.

Morfología y ordenación taxonómica. Las cianobacterias incluyen formas uni y pluricelulares, y pueden clasificarse en cinco grupos por criterios morfológicos (Fig. 3.22).

Grupo 1: Como **cianobacterias chroococcales** se cuentan bacilos y cocos unicelulares. Las células se presentan aisladas o en forma de agregados celulares, que se mantienen reunidos por cápsulas o limos. La multiplicación se da exclusivamente por división binaria o gemación. A él pertenecen *Synechococcus* (antes *Anacystis nidulans*), *Gloeocapsa*, *Gloeothece* y *Gloeobacter violaceus*.

Grupo 2: Las **cianobacterias pleurocapsales** abarcan igualmente formas unicelulares, pero sólo aquellas que (también) se reproducen por división múltiple. En el interior de las células en división aparecen muchas células pequeñas, los llamados beocitos. Como ejemplo citemos los géneros *Pleurocapsa*, *Dermocarpa* y *Myxosarcina*.

Los tres grupos siguientes se caracterizan por formar reuniones filamentosas de células; forman tricomas, esto es, cadenas de células. El crecimiento es intercalar, por división celular en el interior del tricoma. Los tri-

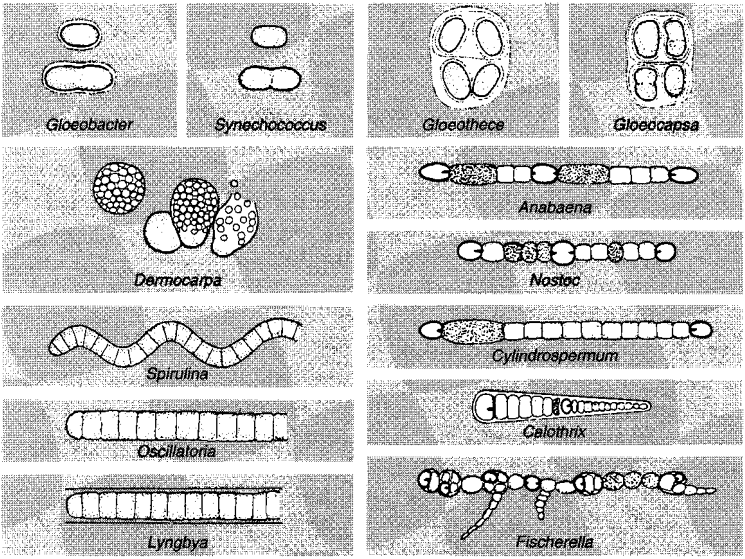

Gloeobacter
Synechococcus
Gloeothece
Gloeocapsa
Dermocarpa
Anabaena
Nostoc
Spirulina
Cylindrospermum
Oscillatoria
Calothrix
Lyngbya
Fischerella

Fig. 3.22 Representación esquemática de algunas cianobacterias. Símbolos: las paredes celulares gruesas y los gránulos polares representan a los heterocistos: las células rellenas indican acinetos; las líneas finas por fuera de los tricomas indican vainas (según Rippka, R., J. Deruelles, J.B. Waterbury, M. Herdman, R.Y. Stanier: J. gen. Microbiol. 111 [1979] 1, vuelto a dibujar).

comas son móviles por deslizamiento. La reproducción se realiza por "rotura" del tricoma y formación de hormogonios. Por ello, a las cianofíceas filamentosas se las llama también cianofíceas hormogonales. Entre estas cianobacterias formadoras de tricoma se diferencian tres grupos.

Grupo 3: **Cianobacterias filamentosas sin heterocistos**. Los tricomas constan exclusivamente de células vegetativas. Los típicos del grupo son *Oscillatoria*, la conocida "alga oscilante", *Spirulina*, *Lyngbya*, *Phormidium* y *Plectonema*.

Grupo 4: **Cianobacterias filamentosas con heterocistos**. En los tricomas cultivados en ausencia de nitrógeno combinado aparece una diferenciación en heterocistos. En algunas formas aparecen también acinetos. A este grupo pertenecen los géneros *Anabaena*, *Nostoc* y *Calothrix*.

Grupo 5: **Cianobacterias filamentosas con heterocistos**. Las pertenecientes a este grupo se diferencian de las del anterior por la división celular en más de un plano. El género más conocido es *Fischerella*.

Ecología. Las cianobacterias están extendidas en lagos y otras aguas, en suelos y en arrozales. A simple vista se reconocen por un crecimiento azul oscuro o negro sobre las rocas, en las zonas salobres o de mareas de lagos de agua dulce o marinas. Las bandas negras visibles en las rocas calcáreas ("rayas de tinta") que señalan el agua de escorrentía se deben a cianobacterias chroococcales. En lagos eutróficos se da frecuentemente una reproducción masiva de cianobacterias azul verdosas (*Anabaena*) o de coloración roja (*Oscillatoria rubescens*), que se conoce como "floración" ("Wasserblüte") (pág. 589). Por su capacidad de fijar nitrógeno, muchas formas son pioneras en hábitats pobres en nutrientes, como p. ej. en arena de mar y en rocas del desierto, donde en pequeñas fisuras encuentran protección y humedad, creciendo de forma endolítica. Tampoco se asustan de otros hábitats extremos. Algunas cianobacterias unicelulares (*Synechococcus lividus*) son tan acidotolerantes y termófilas, que pueden crecer en fuentes ácidas y termales (pH 4,0; 70°C). Otras especies viven como simbiontes: *Nostoc* en el liquen *Peltigera*, así como en las raíces de *Cycas* y de *Gunnera*; *Anabaena azollae* en cavidades de las hojas del helecho tropical acuático *Azolla*.

La célula, su estructura y componentes. Desde el punto de vista de la ultraestructura celular las cianobacterias concuerdan ampliamente con las bacterias Gram negativas (Fig. 2.4). El protoplasto está rodeado por una pared celular, que por encima de la capa de glucopéptido lleva una "membrana externa" y una capa de lipopolisacárido. Muchas formas excretan un exopolisacárido, que o bien se disuelve en forma de limo o bien rodea a las células como **cápsulas** o como **vainas**.

El **aparato fotosintético** está en forma de **tilacoides**, que se disponen de forma paralela a la membrana citoplasmática o bien están enrollados varias veces en el espacio protoplasmático periférico (véase Fig. 3.23). La membrana de los tilacoides contiene clorofila a, ß-caroteno y oxocarotenoides, como la mixoxantofilla, equinenona y zeaxantina, además de los componentes del transporte de electrones fotosintético. Lo especial de los tilacoides de las cianobacterias (y rodofíceas) son los ficobilisomas: estructuras discoidales adosadas a la parte externa de los tilacoides. Están formadas por las ficobiliproteínas ficocianina (75%), aloficocianina (12%) y ficoeritrina, así como por algunos polipéptidos incoloros; estos últimos suponen en conjunto el 12%. Las ficobiliproteínas están compuestas a su vez por proteínas y los grupos prostéticos ficocianobilina y ficoeritrobilina. Por su función, actúan como los pigmentos antena de las cianobacterias; la energía absorbida por ellos se transfiere principalmente al fotosistema II. La clorofila a suministra exclusivamente al fotosistema I. Los ficobilisomas pueden suponer hasta la mitad de la proteína total de las células.

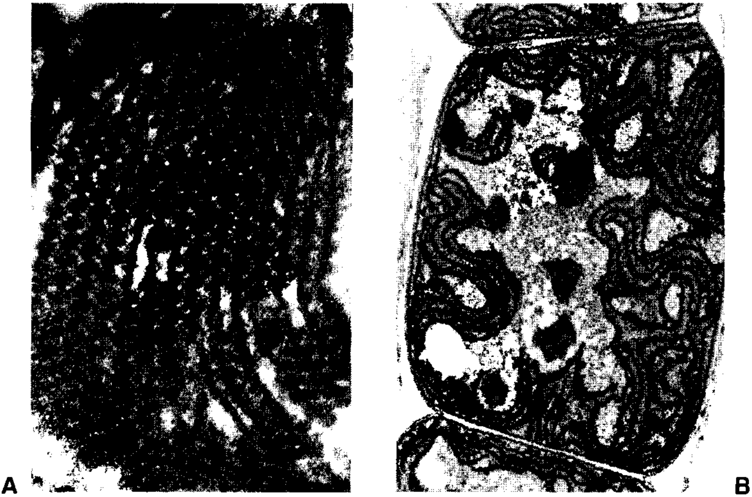


Fig. 3.23 Los sistemas de membranas fotosintéticas de las cianobacterias. **A** Hileras de ficobilisomas sobre membranas de tilacoides de *Microcoleus vaginatus.* **B** En *Nostoc muscorum* las lamelas dobles (membranas de los tilacoides) discurren aisladas o en grupos ondulados. Se aprecia el límite externo de la pared celular multicapa (A: de WILDMAN, R.B., C.C. BOWEN: J. Bacteriol. 117 [1974] 866; B: de MENKE, W.: Z. Naturforsch. 16b [1961] 543).

Las ficobilinas son muy semejantes a los pigmentos biliares. Para su síntesis se ha de producir primero porfirina; al abrirse el anillo se libera como CO el átomo de carbono del puente metínico. La síntesis de las ficobilinas es uno de los pocos procesos conocidos en los que se forma CO.

Sólo en algunas cianobacterias, *Gloeobacter violaceus*, no hay tilacoides ni ficobilisomas; la clorofila a se localiza en la membrana citoplasmática, y las ficobiliproteínas están en la cara interna de la membrana como una capa cerrada directamente superpuesta.

En muchas cianobacterias el color de la luz influye en la relación entre el pigmento azul y rojo. Con luz verde o azul se favorece la ficoeritrina y con luz roja la ficocianina. Esta "adaptación cromática" complementaria es buena para el aprovechamiento de la luz en distintos hábitats (bajo una cubierta foliar o con luz azul en capas de aguas profundas).

Inclusiones celulares. Las cianobacterias pueden almacenar polisacáridos en forma de **gránulos de glucógeno** y gránulos de polifosfato. El **poli-ß-hidroxibutirato** sólo es almacenado por pocas especies.

Un tipo de material de reserva que sólo se encuentra en las cianobacterias son los **gránulos de cianoficina**. Son polipéptidos porque se tiñen con los colorantes de las proteínas. Están formados por un polipéptido de ácido asparagínico, en el que todos los grupos carboxilo están enlazados con arginina: están formados por tanto por aspartato y arginina en la relación 1:1. Al parecer este polímero sirve como reserva de N; disminuye cuando hay déficit de N y vuelve a aumentar cuando se añade fuente de N. Se almacena predominantemente en los heterocistos. Podría tratarse también de una modesta reserva de energía, ya que la arginina también conduce a una regeneración de ATP en condiciones anaeróbicas cuando se rompe en ornitina y carbamilfosfato.

Carboxisomas (pág. 78). Están ampliamente distribuidos entre las cianobacterias. Las formas acuáticas, que viven en lagos estratificados o que aparecen como floraciones, están provistas casi siempre de **vacuolas de gas**.

Células especializadas. Las cianobacterias disponen de células muy diferenciadas, no comparables en ningún otro grupo bacteriano.

Heterocistos. Llamaron ya la atención al observarlos al microscopio óptico por sus paredes celulares gruesas, la débil pigmentación y los gránulos polares birrefringentes. La microscopía electrónica ha permitido reconocer su ultraestructura (Fig. 3.24). Los gránulos polares son gránulos de cianoficina. Las capas compactas superpuestas a la pared celular Gram negativa, están compuestas por polisacáridos, en los que se unen mediante enlaces glucosídicos glucosa, galactosa, manosa y xilosa. Los heterocistos son resis-

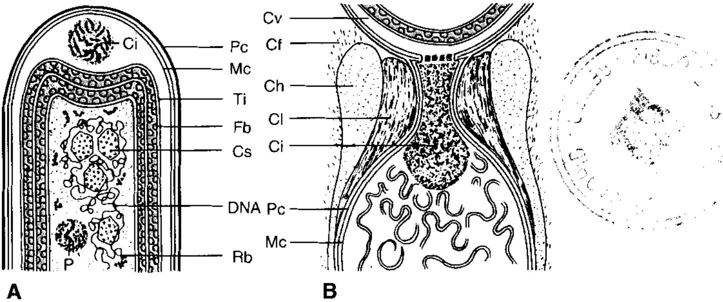


Fig. 3.24 Representación esquemática de cortes longitudinales de células de cianobacterias. A Célula vegetativa, **B** Heterocisto. Abreviaturas: Mc = membrana citoplasmática; Cs = carboxisomas; Ci = gránulo de cianoficina; Cf = capa fibrosa; Ch = capa homogénea; Cl = capa lamelar; P = polifosfato; Fb = ficobilisoma; Rb = ribosomas; Ti = tilacoide; Cv = célula vegetativa; Pc = pared celular (según STANIER, R.Y. y G. COHEN-BAZIRE: Ann. Rev. Microbiol. 31 [1977] 225, vuelto a dibujar).

tentes frente a la acción de la *lisozima*. Los heterocistos se comunican con las células vegetativas vecinas del tricoma mediante poros.

Desde el punto de vista funcional los heterocistos son el **lugar de la fijación del N_2** en condiciones anaeróbicas. Su formación se desencadena cuando las cianobacterias filamentosas tienen un déficit en nitrógeno combinado (NH_4^+, NO_3^-). La diferenciación morfológica se acompaña de modificaciones químicas. En los heterocistos se forma *nitrogenasa*, se descomponen las ficobiliproteínas, mientras que se mantiene la clorofila a. Los heterocistos maduros no tienen, por tanto, ficobiliproteínas, ningún fotosistema II funcional y no pueden producir oxígeno. Sólo tienen el fotosistema I, lo que les permite una fotofosforilación cíclica y una regeneración de ATP. Por ello, en los heterocistos se dan todas aquellas condiciones necesarias para el funcionamiento de la *nitrogenasa*, sensible al oxígeno. Reciben compuestos carbonados de las células vegetativas y ceden nitrógeno combinado, sobre todo en forma de glutamina.

Acinetos. Son células de persistencia. Llaman la atención por su tamaño, intensa pigmentación y gruesas paredes. Igual que los heterocistos, se trata de células morfológicamente diferenciadas, que se sitúan intercalarmente (en *Anabaena*) o terminalmente (en *Cylindrospermum*) p. ej. en el tricoma (véase Fig. 3.22).

Hormogonios. Son porciones cortas del tricoma que se forman por fragmentación de tricomas más largos. Su formación sirve para la reproducción. En la formación de los hormogonios hay que sacrificar en las oscilatorias por lo menos una célula, ya que están unidas por una capa de glucopéptido común, que no puede dividirse. Se habla de una división transcelular.

Beocitos. Son "células pequeñas", las células reproductoras de las cianobacterias pleurocapsales. Se producen por una división binaria múltiple de la célula materna, esto es, en el interior de una célula rodeada por una cubierta de exopolisacárido más gruesa y fibrosa, p. ej. de *Dermocarpa*, se dan una serie de divisiones binarias rápidas y sucesivas; se forman de 4 hasta 1000 beocitos.

Movimiento deslizante. Muchas cianobacterias son móviles, así p. ej. las formas con tricomas, todos los hormogonios y muchos beocitos. El movimiento sólo es posible por deslizamiento, para lo que se requiere una superficie sólida. El movimiento es por rotación del tricoma a lo largo del eje longitudinal, de forma que los filamentos parecen oscilar (*Oscillatoria*). *Oscillatoria princeps* describe con respecto a un punto situado en la superficie del tricoma (p. ej. de tinta china) una hélice de 60° de inclinación durante el movimiento. Investigaciones de la ultraestructura de la pared celular han puesto de manifiesto en el interior de la pared celular unas fibrillas con una inclinación aproximadamente del mismo ángulo. La correlación parece indicar que el movimiento se debe a ondas de torsión generadas por las fibrillas. El sentido del movimiento puede invertirse. Muchas cianobacterias son fototácticas y se acumulan en la zona de luz propicia.

Fijación de nitrógeno. Todas las cianobacterias que forman heterocistos son capaces de fijar N_2. Los heterocistos son células especializadas morfológicamente y fisiológicamente para la fijación de N_2 (heterocistos, véase pág. 139). Sorprendió el descubrimiento de que la información genética (genes *nif*) para la formación de la *nitrogenasa* está incluso en las células de las pleurocapsales y en las cianobacterias filamentosas incapaces de sintetizar heterocistos (grupo de *Oscillatoria*). La expresión de la fijación de nitrógeno está no obstante impedida en las condiciones normales de crecimiento, ya que el enzima *nitrogenasa* es muy sensible frente al oxígeno. Experimentalmente se ha podido desencadenar la síntesis de la *nitrogenasa* y demostrar el enzima. Si se incuban células en ausencia de nitrógeno combinado en condiciones anaeróbicas en la luz y se inhibe el fotosistema II (ninguna producción de O_2) con la adición del herbicida DCMU (diclorofenilmetilurea), entonces se forma *nitrogenasa*. Mediante este truco se ha conseguido demostrar la capacidad de sintetizar *nitrogenasa* en más de la mitad de las cepas investigadas.

También entre las cianobacterias chroococcales se encuentran algunas cepas capaces de fijar N_2. Aún no se sabe cómo se protege en ellas la *nitrogenasa* del oxígeno producido en la fotosíntesis.

Metabolismo anaeróbico. Algunas cianobacterias se encuentran en capas de agua que contienen concentraciones considerables de sulfhídrico (aproximadamente 5 mmol/l). Investigaciones en *Oscillatoria limnetica* han demostrado que el fotosistema II no funciona en presencia de sulfhídrico, y que se desarrolla una fotosíntesis anoxigénica tal como la que se conoce en las bacterias rojas del azufre anaeróbicas.

$$CO_2 + 2\ SH_2 \longrightarrow [CH_2O] + H_2O + 2\ S$$

La capacidad de muchas cianobacterias de desarrollarse facultativamente de forma anaeróbica es importante probablemente sólo en unos pocos hábitats.

Fotoautotrofismo estricto. Muchas cianobacterias son aparentemente fotoautótrofos obligados; sólo pueden crecer en presencia de luz. Únicamente unas pocas cepas son capaces de crecer alternativamente de forma quimioorganotrófica oxidando azúcares en la oscuridad; la tasa de crecimiento es siempre muy inferior que en condiciones fotoautotróficas.

Bacterias proclorales. Recientemente se han encontrado procariotas fotosintéticos que tienen caracteres de procariotas y de clorofíceas. Tienen por una parte la estructura celular típica de los procariotas (pared celular Gram negativa, con ácido murámico, ningún orgánulo, sin núcleo, DNA genómico con una masa de $3{,}6 \cdot 10^9$), pero junto a la clorofila a contienen también clorofila b, que sólo se presenta en las algas verdes y vegetales. Se diferencian también de las cianobacterias porque no tienen ficobiliproteínas, ni cianoficina, ni poli-ß-hidroxibutirato. Hasta ahora se han encontrado dos bacterias proclorales tan próximas a las cianobacterias. *Prochloron* crece como ectosimbionte de distintas especies de ascidias, pero casi no puede cultivarse en medios de cultivo. *Prochlorothrix hollandica* es una bacteria filamentosa de vida libre en lagos de agua dulce y que puede cultivarse con luz en medios de cultivo minerales.

4. Los virus: propagación y estructura

La denominación virus (veneno) se aplicó inicialmente a los agentes causantes de enfermedades que se conocían mal. El concepto quedó ligado finalmente al grupo de patógenos descritos en 1892 por IWANOVSKI, cuyos miembros eran capaces de atravesar filtros para bacterias, los "virus filtrables" o simplemente "virus". Los virus se diferencian de los microorganismos por las siguientes **características**: 1. Tienen un solo tipo de ácido nucleico, o bien DNA o bien RNA. 2. Para la reproducción únicamente es necesario el ácido nucleico. 3. No son capaces de reproducirse fuera de células vivas. Por tanto, los virus no son organismos independientes, sino que necesitan células vivas para su reproducción. La reproducción tiene lugar en la célula hospedadora. Para la replicación del ácido nucleico y para la síntesis de la cubierta proteica el virus depende de la célula hospedadora. El desarrollo conduce a la muerte de la célula hospedadora. Fuera de la célula hospedadora el virus se presenta como partícula vírica o virión. Está compuesto por el ácido nucleico y una cubierta proteica, el cápsido. La partícula vírica es un **nucleocápsido**.

Los virus se reconocen por las consecuencias de su desarrollo en el hospedador. Pueden destruir totalmente complejos celulares y provocan lesiones tisulares, áreas de necrosis o halos de lisis (Fig. 4.1). Los hospedadores normales de los virus son plantas, animales y microorganismos.

Virus vegetales. Los virus de los vegetales llegan al interior de la célula a través de lesiones, no penetran en la planta de una forma activa. La demostración cuantitativa de los virus vegetales se basa en el desarrollo de necrosis alrededor de lesiones primarias realizadas artificialmente. En la naturaleza los virus se transmiten por contacto directo o por vectores. Frecuentemente los virus llegan a los tejidos vegetales por lesiones debidas a fricciones. En la planta cabellos de monte (*Cuscuta*) los haustorios penetran en otras plantas y establecen con su sistema de vasos una comunicación directa entre dos plantas, a través de la que pueden ser transportados los virus. Numerosos virus son transmitidos por insectos. En algunos casos el virus se multiplica en el tracto digestivo del insecto (virus persistentes); en estos casos la nueva infección de una planta sólo es posible después de un cierto tiempo de incubación en el insecto. Los virus no persistentes son transmitidos directamente por la picadura del insecto de forma pasiva. Numerosas enfermedades de los vegetales están determinadas por virus. De gran importancia económica son los virus de la patata. El virus vegetal mejor estudiado es el del mosaico del tabaco (TMV). El material genético de los virus vegetales es RNA.

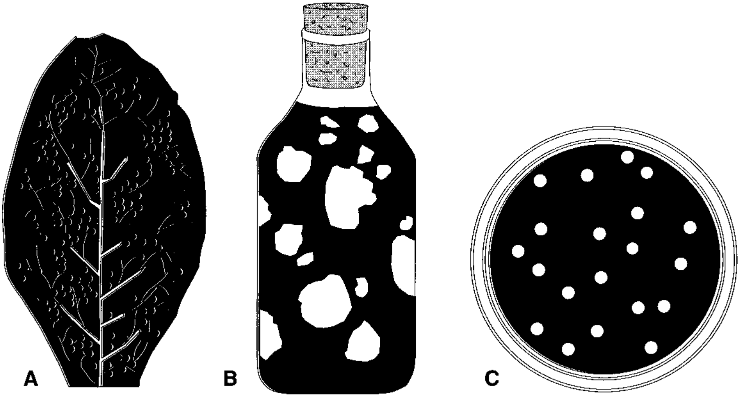


Fig. 4.1 Detección de la presencia de virus por las superficies necrosadas o por los halos líticos causados por los mismos. A Necrosis del virus del mosaico del tabaco sobre una hoja. **B** Zonas de lisis del virus de la poliomielitis en un cultivo de tejidos. **C** Placas de lisis o calvas de bacteriófagos sobre un cultivo continuo de bacterias.

Virus patógenos de animales. Los virus desencadenan enfermedades en hombres y animales: viruela, viruelas locas o varicela, sarampión, rabia, poliomielitis, infecciones gripales, constipados, glosopeda, etc. Se transmiten por contacto o por insectos y penetran aparentemente en la célula por fagocitosis o pinocitosis. Para investigar los virus en el laboratorio hay que recurrir a animales de experimentación o a embriones de pollo. Algunos virus pueden reproducirse también en cultivos de tejidos y demostrarse cuantitativamente. El material genético de los virus animales es DNA o RNA. Mientras que el DNA generalmente se presenta en forma de doble hélice, los virus RNA tienen una cadena polinucleotídica única o doble.

Virus bacterianos. Los virus que tienen como hospedadores a las células bacterianas son los bacteriófagos. No debe haber prácticamente ninguna bacteria para la que no pueda encontrarse un virus después de una búsqueda intensa. Los bacteriófagos se reconocen por la formación de placas o calvas sobre un tapiz o cultivo confluente de bacterias. En suspensiones bacterianas se reproducen tan rápidamente que pueden lisar en poco tiempo a todas las células. El ácido nucleico de los bacteriófagos es DNA o RNA de una o doble cadena. Como modelo se han estudiado los bacteriófagos de *Escherichia coli*. La investigación de los bacteriófagos y sus distintos ciclos de desarrollo ha aportado puntos de vista esenciales en los mecanismos de transmisión del material genético de una célula a otra.

4.1 Virus

Organización de los virus. Una **partícula vírica**, también denominada virión, está compuesta por ácido nucleico (DNA o RNA), rodeado por una cubierta proteica. Esta cubierta proteica se denomina **cápsido**. El ácido nucleico rodeado por el cápsido, el **nucleocápsido**, puede presentarse desnudo o incluido en una membrana (Fig. 4.2 y 4.3). Nucleocápsidos desnudos son, por ejemplo, el virus del mosaico del tabaco, el virus de las verrugas y el adenovirus. Rodeados por membranas están el virus de la gripe y el del herpes. Por su parte, un cápsido está compuesto por subunidades, los **capsómeros**. El cápsido tiene generalmente una organización simétrica. Se diferencian dos tipos de simetría, la simetría helicoidal y la simetría cúbica. La tabla 4.1 da una visión general de los virus de acuerdo con su constitución estructural.

Clasificación de los virus. Los virus son extraordinariamente específicos en cuanto a su hospedador, y dentro de él se especializan en determinados tejidos o células. Por ejemplo, entre los virus animales se habla de virus neurotrópicos, cuando se desarrollan en células neuronales, virus linfotrópicos (en linfocitos), virus mixotrópicos (en el glucocáliz de epitelios, membranas mucosas).

Los virus que afectan a los vegetales se denominan de acuerdo a los síntomas de la enfermedad y a sus hospedadores. Es muy bajo el número de virus de hongos, algas y protozoos que se han investigado. Los bacterió-

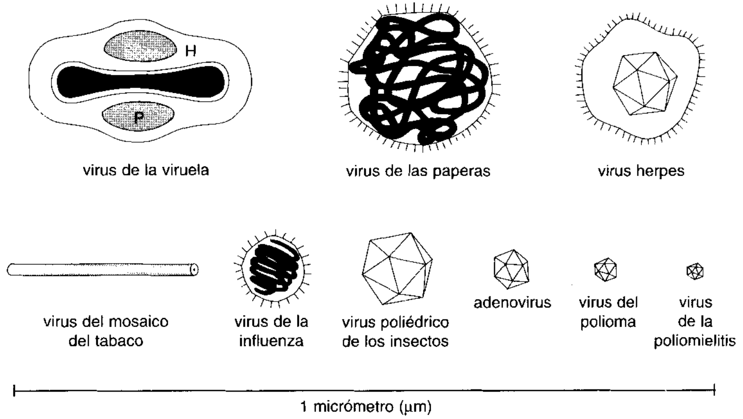
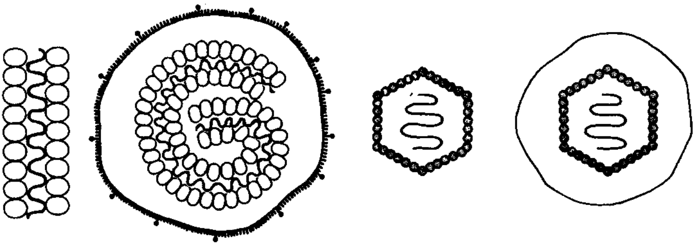

H
P
virus de la viruela
virus de las paperas
virus herpes
virus del mosaico del tabaco
virus de la influenza
virus poliédrico de los insectos
adenovirus
virus del polioma
virus de la poliomielitis
1 micrómetro (μm)

Fig. 4.2 Forma y tamaño de algunas partículas víricas. Abreviaturas: DNA = DNA vírico, P = partícula proteica elíptica, H = envoltura.



helicoidal desnuda

helicoidal envuelta

icosaédrica desnuda

icosaédrica envuelta

Fig. 4.3 Tipos estructurales de las partículas víricas. Se representan cuatro constituciones: dos con simetría helicoidal y dos con cúbica, dentro de cada tipo uno desnudo y otro recubierto por una envuelta.

Tabla 4.1 Clases morfológicas de virus

	Estructura helicoidal		
	Cápsido desnudo		*Cápsido envuelto*
RNA	Virus del mosaico del tabaco y otros muchos virus vegetales	RNA	Myxovirus: virus de la gripe y parainfluenza
DNA	Colifago fd		(paperas y sarampión)
	Estructura poliédrica (icosaédrica)		
	Cápsido desnudo		*Cápsido envuelto*
RNA	Picornavirus: MKS, ECHO, polio reovirus	RNA	Retrovirus*: sarcoma, leucemia carcinoma
DNAc	Papovavirus*: papiloma, polioma, SV40	RNA	Togavirus: SFV encefalitis, fiebre amarilla
DNAsc	Colifago ΦX174, M13	DNA	Herpes simplex Varicela Virus EB (mononucleosis infecciosa)
	Virus compuestos (cabeza icosaédrica + cola helicoidal)		
DNA	Bacteriófagos grandes (T2, T4, T6)		
	Virus complejos		
DNA	Varicela, vacuna		

Abreviaturas: MKS, glosopeda; SFV, virus "Semliki Forest"; EB, Epstein-Barr; SV "Simian virus"; ECHO, "enteric cytopathic human orphan virus"; DNAc, cíclico; DNAsc, monocatenario, circular y cerrado.

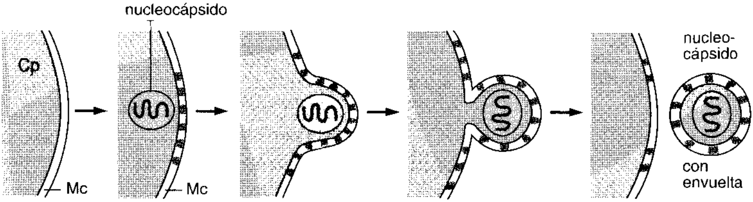
* Virus oncogénicos

fagos se denominan según su hospedador, a partir del cual se hayan aislado por primera vez. La división de los virus patógenos de animales se establece generalmente mediante un nombre de familia que hace referencia a los síntomas de la enfermedad (viruela, tumor), naturaleza y tamaño del ácido nucleico (pico-RNA) o incluso según el mecanismo de replicación del ácido nucleico (retrovirus). El número de virus conocidos es enorme y la limitada descripción que vamos a hacer intenta resaltar su papel como patógenos y los grandes avances en los conocimientos de la Biología Molecular, que se han conseguido en el estudio de los virus.

Estructuras víricas. A continuación se presentan cuatro virus conocidos como patógenos: dos viriones de simetría helicoidal, de ellos uno sin cubierta (virus del mosaico del tabaco) y otro con cubierta (virus de la gripe o influenza), así como dos viriones de simetría cúbica, uno sin cubierta (virus poliédricos y de la poliomelitis) y otro con cubierta (herpesvirus).

Virus del mosaico del tabaco. El virus del mosaico del tabaco (TMV) es el ejemplo clásico de un virión de simetría helicoidal. Puede aislarse fácilmente del jugo obtenido por homogeneización de plantas enfermas que han sido atacadas por el TMV. Aparece como unos bastoncillos con un diámetro de 18 nm (Fig. 4.4A). Este nucleocápsido en forma de palillo está compuesto aproximadamente por unos 2100 capsómeros. Éstos están ordenados helicoidalmente y forman un cilindro hueco. Cada capsómero está compuesto por una cadena polipeptídica de 158 aminoácidos de secuencia conocida. En la pared del cilindro hueco y entre los capsómeros se incluye el RNA; la cadena de RNA sigue a la hélice (Fig. 4.4B).

Virus de la gripe. Las partículas del virus de la gripe o influenza tienen un diámetro de 110 nm (Fig. 4.5A). El nucleocápsido, al igual que el TMV, está ordenado helicoidalmente, pero no tiene forma de palillo sino que está enrollado varias veces (Fig. 4.5B). El nucleocápsido está rodeado por una cubierta. La cubierta es parte de la membrana de la célula hospedadora de la que ha surgido el virión. La cubierta lleva en su cara exterior unas prolongaciones aciculares (spikes); éstas sirven para la adsorción del virión a la célula hospedadora y contienen mucoproteínas y el enzima *neuraminidasa*. Este enzima elimina un componente de las mucoproteínas de la célula hospedadora (ácido *N*-acetilmurámico) y tiene aparentemente una función en la fluidificación de la mucosa que recubre a las células epiteliales de la cavidad nasofaríngea. La reproducción del virus tiene lugar en la célula hospedadora. La liberación del virión se realiza como una especie de gemación. Manifiesta que la cubierta de la partícula vírica está compuesta por la membrana de la célula hospedadora, que puede estar modificada libremente por proteínas determinadas por el virus (p. ej. *neuraminidasa*).



Hay muchos tipos de virus de la gripe. El tipo de tejido que resulte afectado depende de la especificidad de hospedador por parte del virus y de las características receptoras de las células. El virus puede conducir a un entorpecimiento del metabolismo o a una lesión de la célula. Tiene acción antigénica y determina en el hospedador la formación de anticuerpos. Los virus responsables de las grandes epidemias de gripe se diferencian por su virulencia y patogenicidad.

Virus poliédricos sin envuelta. Muchos virus de apariencia esferoidal son poliédricos. La forma poliédrica preferida es el icosaedro, un cuerpo delimitado por 20 triángulos equiláteros con 12 esquinas (Fig. 4.5C y 4.6). El cápsido de un virus icosaédrico está compuesto por dos tipos de capsómeros: en los vértices se sitúan pentágonos (pentones) constituidos por cinco monómeros proteicos (protómeros); las caras y los vértices están

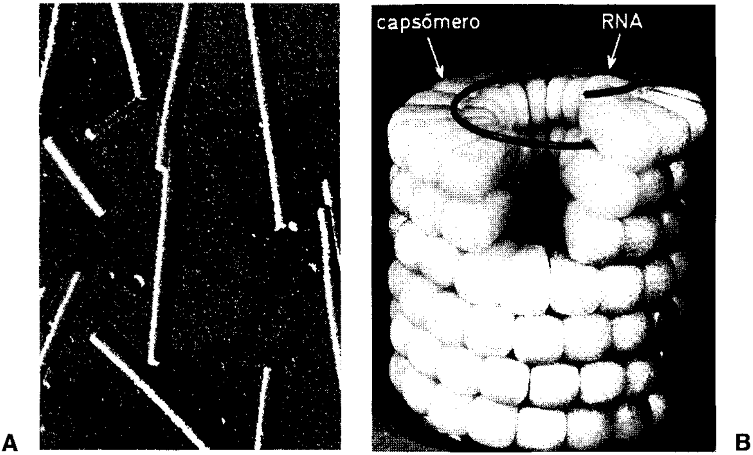


Fig. 4.4 Virus del mosaico del tabaco. A Micrografía electrónica de un sombreado con carbón y platino; 65 000 aumentos (Foto H. Frank); **B** Modelo (de Karlson, Kurzes Lehrbuch der Biochemie, Thieme, Stuttgart 1980).

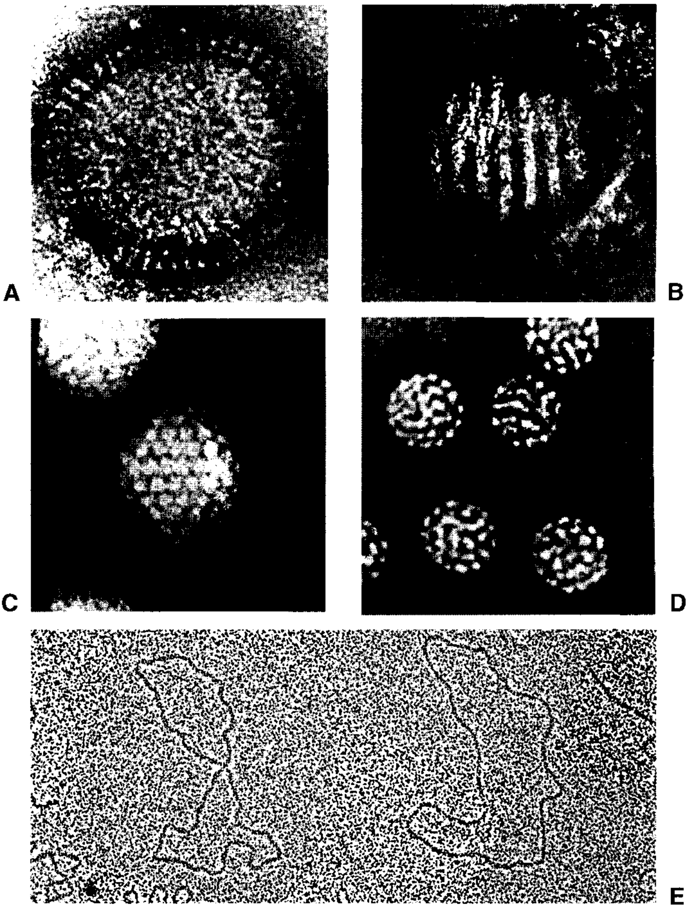


Fig. 4.5 Distintos virus patógenos de animales, su ácido nucleico. A Virus A2 de la gripe. **B** Nucleocápsido del virus A2 de la gripe, en una partícula rota (como A) el colorante de contraste ácido fosfotúngstico ha penetrado y hace que el nucleocápsido sea visible. **C** Adenovirus, se reconoce la forma icosaédrica de la partícula. **D** SV40 (Simian Virus 40) es un virus tumoral de tamaño notablemente inferior al adenovirus, de constitución también icosaédrica, pero tiene un aspecto redondeado. **E** DNA del SV40, las moléculas circulares, de doble cadena tienen un perímetro de aproximadamente 1,6 µm, a la izquierda y a la derecha se ven los extremos de anillos rotos; aumentos: (A) a (D) 250 000, (E) 65 000; preparación: (A) a (D) contraste negativo con ácido fosfotúngstico (Fotos A, B, D, E de H. Frank, (C) H. Gelderblom, Instituto Max-Planck de Virología, Tübingen).

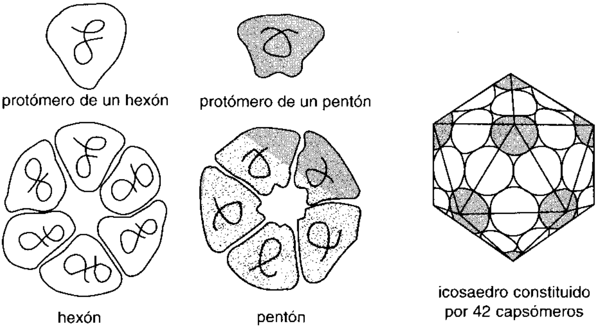


Fig. 4.6 Posibles componentes del cápsido de virus icosaédricos. Se representan dos tipos de capsómeros: un capsómero hexagonal (hexón) y un capsómero pentagonal (pentón); el primero está compuesto por 6 protómeros y el segundo por 5, cada uno de los cuales está constituido a su vez por una o dos cadenas polipeptídicas. Junto a ellos se representa un icosaedro formado por 12 pentones y 30 hexones (= 42 capsómeros).

compuestos por hexágonos (hexones), constituidos por seis protómeros. La organización del cápsido a partir de los capsómeros sigue las leyes de la cristalografía; según ello, el cápsido menor icosaédrico debería tener 12 pentones, el siguiente 12 pentones y 20 hexones. Existen virus con 252, e incluso 812 capsómeros.

Según el principio del icosaedro se constituyen muchos virus: el virus de la poliomielitis, el de la glosopeda bovina, el adenovirus (Fig. 4.5C) y el virus tumoral SV40 (Fig. 4.5D).

La constitución de los cápsidos de los virus a partir de un gran número de subunidades idénticas se comprende cuando se piensa que los ácidos nucleicos de muchos virus tienen una masa relativa pequeña, esto es, son muy cortos y la información que albergan sólo permite la síntesis de pocas cadenas polipeptídicas, de las cuales la mayoría tiene función enzimática en la reproducción vírica. El principio de la organización del cápsido a partir de un número elevado de subunidades idénticas garantiza un efecto máximo con un requerimiento genético mínimo.

Virus poliédricos envueltos. La arquitectura icosaédrica rodeada por una envuelta membranosa es, por ejemplo, la del causante de la varicela, del herpes zóster y otros herpes.

El cápsido icosaédrico del herpesvirus está compuesto por 162 capsómeros. La membrana de la envuelta procede con toda seguridad de la membrana nuclear interna de la célula hospedadora. Los herpesvirus se multiplican en el núcleo de la célula hospedadora. Los cápsidos se rodean entonces por la membrana nuclear interna, se liberan por gemación y se conducen al exterior por el sistema del retículo endoplasmático.

La varicela es una enfermedad infantil leve. El virus de la varicela infecta al tracto respiratorio superior y se disemina a través de la sangre; por último, se localiza en la piel y provoca la aparición de vesículas en forma de manchas. El herpes zóster se presenta en personas parcialmente inmunes; se produce por reactivación del virus de la varicela. Por tanto, las dos enfermedades están ocasionadas por el mismo virus.

Virus de la viruela. Los virus de la viruela son los mayores entre los patógenos de animales. Están constituidos de una forma totalmente distinta a los cuatro tipos expuestos anteriormente. Contienen DNA, proteínas y varios lípidos, por lo que también reciben el nombre de viriones complejos (Tab. 4.1). Las partículas víricas de la viruela y de la vacuna tienen el aspecto de sillares redondeados. Se componen de un cuerpo interno que contiene el DNA de doble cadena, una capa doble que contiene proteínas, cuerpos proteicos elípticos y una membrana envolvente; están rodeados por unos filamentos estrechamente adosados. Las partículas víricas son muy resistentes a la desecación y por tanto muy infecciosas. La viruela (pústulas) sólo puede afectar al hombre o a los monos. Susceptibles al virus de la vacuna son los terneros, los conejos y los corderos. Los dos virus, el de la viruela y el de la vacuna tienen antígenos comunes. Por ello se inyecta al hombre como prevención con virus de la vacuna que se obtienen de terneros y que en el hombre sólo desencadena síntomas patológicos muy leves. Esta "vacunación" activa conduce a la formación de anticuerpos séricos, que confieren también inmunidad contra la viruela.

4.2 Virus bacterianos (bacteriófagos)

Aislamiento y demostración. Los bacteriófagos pueden aislarse fácilmente suspendiendo material de un hábitat en el que se encuentre de forma natural la especie bacteriana implicada, junto con la propia bacteria en un medio de cultivo líquido. Si este cultivo de enriquecimiento se incuba en condiciones bajo las cuales se desarrollen bien las bacterias que nos interesan, los fagos que se encontraban en el inóculo se reproducirán en poco tiempo. El virus se multiplica exclusivamente en células en crecimiento. Por centrifugación o filtración se separan las bacterias y en el sobrenadante o en el filtrado, el "lisado", se puede determinar el número de fagos ("titulación"). Si se inocula un medio de cultivo sólido con una suspensión de bacterias sin fagos se forma un tapiz o cultivo confluente de bacterias, pero si se inocula una suspensión que contenga unos pocos bacteriófagos se forman unas calvas o placas en el cultivo continuo. En los lugares donde haya habido un fago y haya atacado a una bacteria tiene lugar rápidamente la lisis de un número cada vez mayor de bacterias, hasta que el área infectada por los fagos se hace visible macroscópicamente, como una mancha sin bacterias que sobresale del fondo del cultivo continuo de bacterias (Fig. 4.1C). Mediante métodos apropiados se pueden reproducir rápidamente a los bacteriófagos sobre cultivos continuos de bacterias en medios sólidos o en suspensiones bacterianas. A continuación se aislan los fagos por centrifugación, se mata con cloroformo a las bacterias residuales y se obtiene un lisado de fagos, que por lo general contiene de 10^{10} hasta 10^{13} fagos por mililitro.

Morfología de los bacteriófagos. La morfología de los bacteriófagos se aclaró predominantemente en los fagos de la serie T de *Escherichia coli.* El colifago T2 está compuesto por una cabeza poliédrica de 100 nm de largo sobre la que se adosa una cola de aproximadamente la misma longitud. Se habla por ello de virus compuestos (Tab. 4.1). La cabeza está constituida por capsómeros y encierra al DNA. Proteína y DNA se encuentran aproximadamente en la misma proporción. La cola del T2 es compleja y se compone por lo menos de tres partes: un cilindro hueco está rodeado por una envoltura contráctil, en cuyo extremo distal se localiza una placa basal con espículas y tentáculos de adsorción específicos del hospedador. Las micrografí-

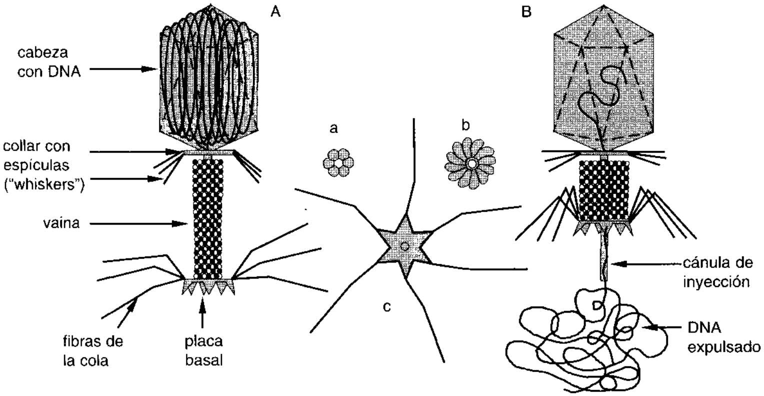


Fig. 4.7 Modelo de un fago T2. A Fago con la vaina extendida antes de la adsorción; **B** Fago con la vaina contraída después de la adsorción y la inyección. Explicación: (a) Sección transversal de la cola extendida: 6 subunidades proteicas de la vaina en un plano; (b) Sección transversal de la cola contraída: 12 subunidades proteicas de la cola en un mismo plano; (c) Visión frontal de una placa basal de un fago antes de la adsorción con las fibras de la cola libres.

as electrónicas de preparaciones con tinción negativa de fagos permiten reconocer dos estados. En uno de ellos la cabeza aparece claramente diferenciada sobre el fondo denso a los electrones y la vaina de la cola está estirada. En el otro estado la cabeza sólo presenta un contraste débil y la vaina está contraída. La figura 4.7 esquematiza esta observación. El primer estado (A) representa al fago activo, que contiene DNA; el segundo (B) corresponde al fago después de la inyección del DNA en una bacteria.

Muchos bacteriófagos tienen una constitución más sencilla. Según la forma de los fagos maduros pueden diferenciarse varios tipos (Fig. 4.8 y 4.9). La mayoría de los bacteriófagos tienen DNA de doble cadena. En el curso de los últimos años se han encontrado varios fagos con DNA de una sola cadena y otros igualmente con RNA de una cadena. Los fagos RNA de los tipos fr (Fig. 4.9E), R17, Qß y otros tienen los menores genomas que se conocen: 3500-4500 nucleótidos.

4.2.1 Multiplicación de un fago virulento: ciclo lítico

La multiplicación de los virus en su célula hospedadora es un proceso muy complejo. Cada uno de los procesos de síntesis, desde la infección de la célula hospedadora hasta la liberación de la partícula vírica madura transmisible, se han aclarado ampliamente en los bacteriófagos de la serie T (T2, T4 y T6) desde los puntos de vista bioquímico, genético y morfológico. Premisas apropiadas para estas investigaciones las ofrecía el hecho de que el DNA fágico contiene la base 5-hidroximetil-citosina en lugar de la citosina, por lo que su síntesis puede seguirse fácilmente estudiando la aparición de esta base; además podían obtenerse bacteriófagos mutantes en los que estuviese bloqueado uno u otro de los pasos del proceso de multiplicación, o que sólo se desarrollase bajo circunstancias determinadas. Estos mutantes permitieron reconocer cómo tiene lugar el desarrollo morfológi-

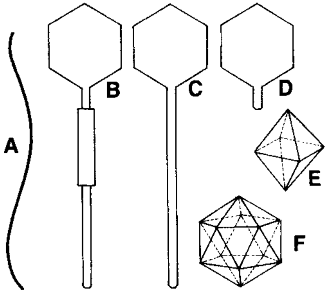


Fig. 4.8 Distintas formas de bacteriófagos (A-D) y formas geométricas de las cabezas fágicas (E, F). **A** Forma filamentosa (colifago fd); **B** Cabeza (de contorno hexagonal) con cola provista de vaina contráctil (por ejemplo, colifagos T2, T4 y T6); **C** Cabeza con cola larga, flexible pero no contráctil (por ejemplo, colifagos T1 y T5); **D** Cabeza con cola corta (por ejemplo, colifagos T3 y T7, fago P22 de *Salmonella*); **E** Octaedro; **F** Icosaedro (según Bradley, D.E.: Bacteriol. Rev. 31 [1967] 230).

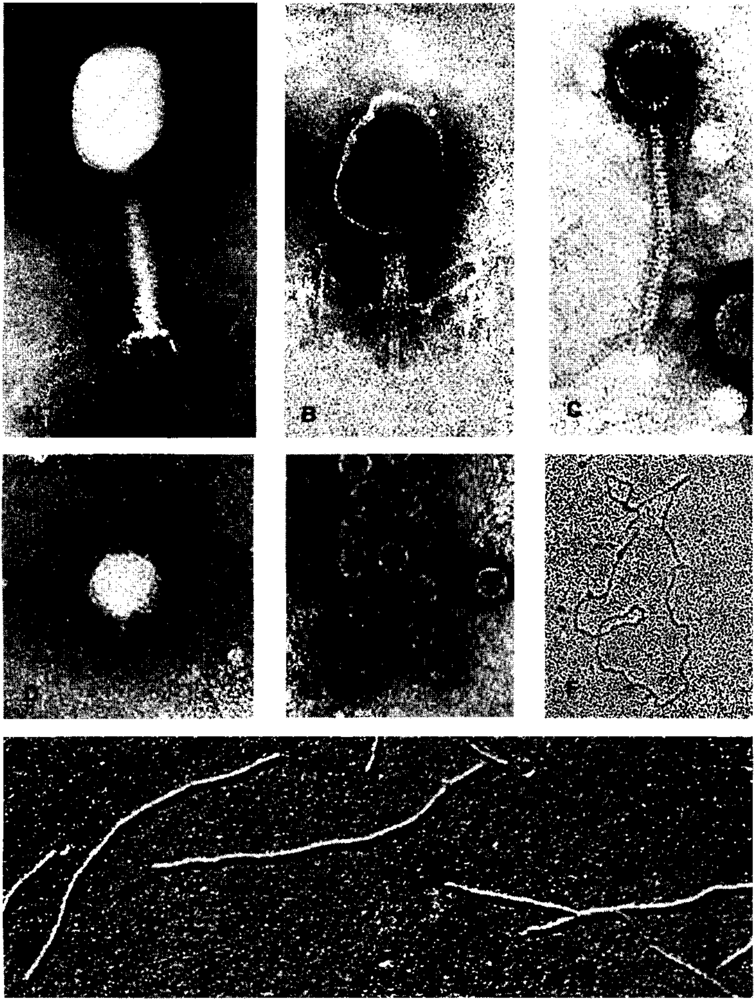


Fig. 4.9 Distintas formas de bacteriófagos. A Colifago T2; **B** T2 con la proteína de la cola contraída y con la cabeza vacía; **C** Colifago λ; **D** Colifago T7 con la cola corta; **E** Colifago RNA fr; **F** Molécula circular del DNA (forma replicativa) del colifago fd; **G** Colifagos fd (con una molécula circular de DNA monofilar); aumentos: desde A hasta E 168 000 aumentos, F y G 50 000 aumentos; técnica de preparación: A y B contraste negativo con ácido fosfotúngstico, (C-E) contraste negativo con acetato de uranilo, (F) extensión con citocromo y sombreado rotacional, (G) sombreado oblicuo (Fotografías H. Frank).

co del fago en la célula hospedadora (morfopoyesis), en qué ordenación temporal se sintetizan las subunidades del fago y cómo se ensamblan.

Al igual que otros virus, los bacteriófagos son también inmóviles. Si se mezcla una suspensión de fagos libres con una suspensión bacteriana podrá establecerse un contacto fortuito con su fijación a la superficie bacteriana (adsorción), a la penetración del DNA en la célula (inyección), y después de un período de síntesis y maduración se liberan los fagos recién formados al medio a través de una lisis de la célula hospedadora (Fig. 4.13).

Adsorción. No todos los fagos son adsorbidos por todas las bacterias. Las relaciones de especificidad entre hospedador y fago se basan en la especificidad de adsorción. Se debe a sustancias receptoras presentes en la pared celular, que están contenidas en la capa lipoproteica para algunos fagos y en la lipopolisacárida para otros. La ausencia de esta sustancia receptora es probablemente la causa de la **resistencia a los fagos** de una bacteria. Si los fagos están en exceso puede darse una adsorción múltiple con 200-300 fagos.

Desarrollo intracelular del fago. A la adsorción le sigue la inyección, la introducción del DNA en la célula. En el fago T2 el proceso de inyección se basa aparentemente en el anclaje de la placa basal, una contracción de la vaina y la penetración consiguiente del cilindro hueco en la célula bacteriana. El hecho de que penetre el ácido nucleico en la célula y que la cubierta proteica quede en el exterior lo han demostrado experimentos con fagos, en los que el ácido nucleico se marcaba con ^{32}P y su cubierta proteica con ^{35}S. La cubierta proteica del fago se podía separar de las células sin que se interfiriese en la multiplicación del fago. Durante el llamado **período de latencia**, que en *Escherichia coli* tiene una duración promedio de 25 min, no pudo demostrarse en células rotas experimentalmente la presencia de fagos. El DNA inyectado del fago desencadena en primer lugar una modificación total del metabolismo de la célula que ha sido infectada (Fig. 4.10): se interrumpe inmediatamente la síntesis del DNA bacteriano. En pocos minutos después de la infección se detiene también la síntesis del RNA bacteriano, así como de las proteínas bacterianas; el contenido total de proteínas aumenta sin embargo continuamente y la síntesis de DNA se reinstaura, incluso a velocidad superior. El DNA fágico se sintetiza inicialmente a partir de DNA bacteriano degradado. Esta transformación y la subsiguiente nueva síntesis de DNA fágico se pueden seguir a través del incremento de la base 5-hidroximetil-citosina específica de algunos fagos T. Los enzimas necesarios para esta síntesis de DNA se forman poco después de la infección; son las llamadas "proteínas tempranas". Entre las "proteínas tardías" se encuentran las proteínas de la cubierta y la *lisozima* fágica o la *endolisina*; no se forman hasta la segunda mitad del período de latencia.

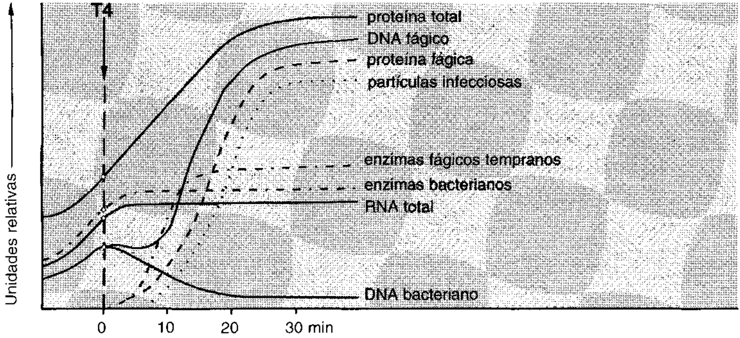


Fig. 4.10 Representación temporal de los procesos de biosíntesis de *E. coli* tras su infección con el bacteriófago T4 (según Luria y Darnell, 1967).

La **maduración final** consiste en la reunión del DNA fágico con la proteína de la envuelta para dar el fago maduro infeccioso. La maduración de los fagos T es un proceso complicado que se realiza por etapas. En primer lugar, las numerosas moléculas de DNA se contraen en partículas que tienen la forma de cabezas de fagos. Después de recubrirse por el cápsido se añaden los componentes de la cola. La sucesión de estos procesos pudo determinarse mediante mutantes letales condicionales, en los que a una temperatura de 25°C todos los procesos sintéticos se desarrollan normalmente, pero que a 43°C se bloquea uno u otro proceso de síntesis.

Por último, la pared celular se ablanda por acción de la *lisozima* fágica y tiene lugar la **liberación** de los fagos. Esta rotura explosiva de las células puede observarse en el microscopio de campo oscuro. La duración del período de latencia y el tamaño de la explosión varían entre unos amplios márgenes, dependiendo del tipo de fago, bacteria y condiciones ambientales (Fig. 4.11). También se ha conseguido infectar bacterias como *Haemophilus influenzae* y *Bacillus subtilis* con DNA nativo aislado de bacteriófagos. Esta transformación genética correspondiente a la infección fágica se denomina también transfección.

4.2.2 El desarrollo de fagos atenuados: lisogenia

Los fagos descritos anteriormente lisan regularmente a las bacterias que infectan y por ello se denominan **virulentos**. Algunos bacteriófagos infectan a su bacteria hospedadora sin multiplicarse y sin conducir a la lisis; estos fagos son **atenuados** (atemperados) y parecen reproducirse sincrónicamente con la bacteria hospedadora. Tan sólo ocasionalmente, en una

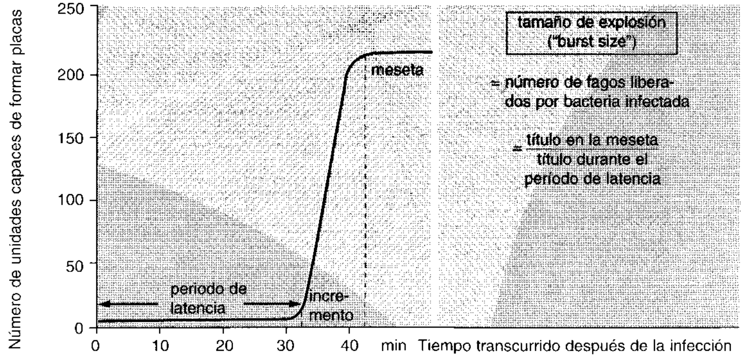


Fig. 4.11 Estudio del período de latencia y del tamaño de explosión. Basado en experimentos realizados acerca de la multiplicación del fago T2 en *E. coli* B. A un cultivo joven de bacterias se le añadió una suspensión de fagos. Después de la infección los fagos no absorbidos fueron inactivados añadiendo un antisuero fágico. Tras una fuerte dilución se tomaron muestras a intervalos regulares de tiempo y se sembraron en agar junto con un exceso de bacterias sensibles a los fagos. Durante 25 minutos el número de unidades capaces de formar placas continuó siendo 5 (período de latencia) pero entonces subió hasta 235 (meseta). Por término medio se han liberado, pues, 47 fagos por bacteria infectada (tamaño de explosión).

de entre 10^2 a 10^5 de estas bacterias **"lisógenas"** se establece espontáneamente una multiplicación fágica y se llega a la lisis. Para la demostración de la liberación de fagos infecciosos se requiere como indicador a otra cepa bacteriana para la que este fago sea virulento. Si se mezclan bacterias lisógenas con un exceso de estas bacterias y se extienden sobre agar nutritivo, las bacterias lisógenas crecen también hasta formar colonias, y ocasionalmente tiene lugar la liberación de algunos fagos. Éstos atacan inmediatamente a las bacterias próximas sensibles y determinan la formación de calvas en el cultivo confluente de bacterias. En el centro de cada uno de los halos se mantiene la colonia de la bacteria lisógena (Fig. 4.12).

Las bacterias lisógenas tienen la capacidad potencial de producir fagos, sin que esta característica se manifieste morfológica o serológicamente. Este estado no infeccioso del fago, que se transmite de una célula a otra, se denomina de **profago**; al igual que otras características de la célula bacteriana el profago se hereda. Como todos los descendientes de una célula lisógena son también lisógenos, el profago ha de replicarse sincrónicamente y regularmente con el cromosoma del hospedador (Fig. 4.13).

Las bacterias lisógenas se comportan como inmunes frente a una infección por el fago que contienen en forma de profago. La modificación genética

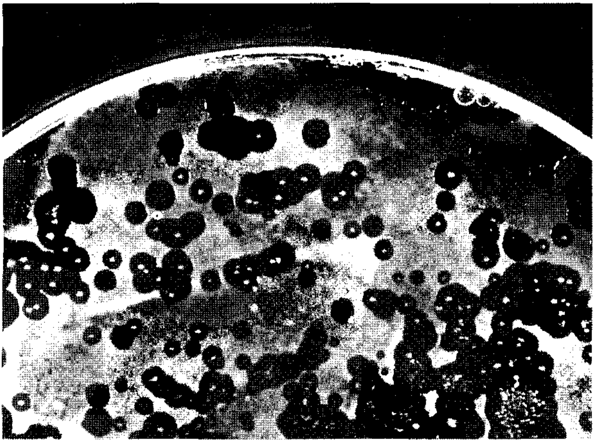


Fig. 4.12 Calvas (placas) formadas sobre un cultivo continuo de bacterias por bacterias lisógenas y fagos libres. Sobre la superficie del agar se sembró una suspensión densa de bacterias no lisogénicas sensibles (*Bacillus megatherium*) que contenía también unas pocas células de una cepa lisogénica de la misma especie así como unos cuantos fagos libres. Los agujeros claros son el resultado de la acción lítica de un fago libre; las colonias centrales se han formado por crecimiento de las bacterias lisogénicas.

del hospedador desencadenada por la lisogenia se denomina también **conversión fágica** (como ejemplo véase la bacteria de la difteria, pág. 102). La **inmunidad** conferida por el profago no se basa en un impedimento de la adsorción (como en la resistencia frente a fagos virulentos), sino en la producción de una proteína represora citoplasmática, que impide la multiplicación de fagos vegetativos. Esta proteína represora impide también el paso del profago al estado vegetativo, así como la formación de otras proteínas fágicas. El establecimiento del estado lisogénico está ligado, por tanto, a la formación de la proteína represora.

De forma espontánea, sin una influencia externa, las bacterias lisógenas sólo se lisan en raras ocasiones. Mediante distintos tipos de influencias (UV, mitomicina C o agentes alquilantes) puede inducirse sin embargo en cada célula la formación y liberación de fagos infecciosos. El éxito de esta **inducción** depende de la constitución genética del profago y del estado fisiológico del hospedador, así como también de las condiciones de cultivo. La inducción se basa aparentemente en la marginación o inactivación de la molécula represora presente. En los mutantes de fagos atenuados que forman un represor fágico termolábil, basta con elevar la temperatura a 44°C para que se induzca la lisis de las bacterias.

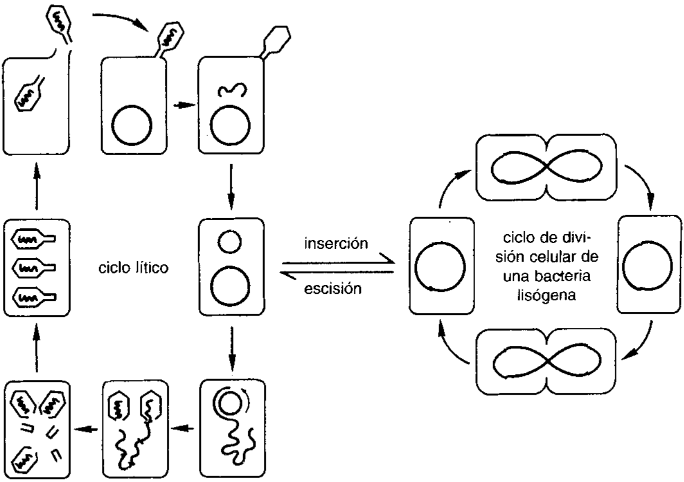


Fig. 4.13 Ciclos vitales de un fago atemperado, representado por el fago lambda. Si *Escherichia coli* es infectada por el fago lambda puede darse una reproducción del fago y una lisis (ciclo lítico) o bien se puede lisogenizar la bacteria. El DNA del fago se presenta como una doble cadena lineal. En el interior de la bacteria se cierra en un anillo. Este anillo puede permanecer autónomo o integrarse en el DNA bacteriano. En el primer caso se desarrolla un ciclo lítico. El DNA circular cerrado se replica. Según el proceso del círculo rodante ("rolling circle") se establece una cadena con muchas copias del DNA fágico. Los genes del fago determinan la síntesis y ensamblaje de proteínas de la cabeza y la cola, y la inclusión de una copia de DNA en la cabeza del fago. Las cabezas y las colas se acoplan de forma espontánea. Al lisarse la célula hospedadora se liberan aproximadamente 100 fagos maduros, que pueden a su vez infectar otras células. Sin embargo, el DNA fágico circular y cerrado puede también perder su autonomía e incluirse en DNA del hospedador. En lugar de inclusión se habla de inserción o integración del DNA fágico. La célula es entonces lisógena para el fago lambda. El fago latente, o profago, se replica junto al cromosoma del hospedador. La bacteria lisógena puede dividirse de forma ilimitada, sin que se produzca la lisis. De forma espontánea o por irradiaciones o tratamientos con agentes mutágenos puede inducirse la liberación (escisión) y multiplicación lítica del DNA fágico.

Integración y desintegración del fago lambda. Investigaciones llevadas a cabo con el fago lambda, lisógeno para *Escherichia coli* K12, han indicado el tipo de relación que se establece entre el profago y el cromosoma bacteriano. La lisogenia del fago lambda es un ejemplo para el estudio del desarrollo de un bacteriófago atenuado. El cromosoma del fago lambda tiene una longitud aproximadamente igual a un 2% de la del cromosoma bacteriano.

En el fago libre el DNA se presenta como una doble cadena lineal (véase Fig. 4.14); no obstante, cada una de las cadenas sobresale en los extremos en un total de 12 nucleótidos. Estos dos extremos de una sola cadena son complementarios entre sí; por apareamiento de bases pueden quedar unidos. Se habla por este motivo de extremos "cohesivos" (sticky). Cuando se mantienen moléculas de DNA de este tipo *in vitro* en disolución, se establece un equilibrio entre DNA circular y lineal debido a la interacción entre las bases complementarias de los extremos de una sola cadena. Esta misma forma circular se presenta también cuando el fago lambda ha infectado a la célula. Las dos aberturas en las cadenas se cierran mediante una *polinucleótido-quinasa*; este enzima bacteriano tiene la función de reparar cortes en una de las cadenas de una molécula de doble cadena por unión de los nucleótidos. Por ello, para pasar de la forma lineal del DNA fágico al estado circular cerrado no hace falta la participación de ningún enzima del fago.

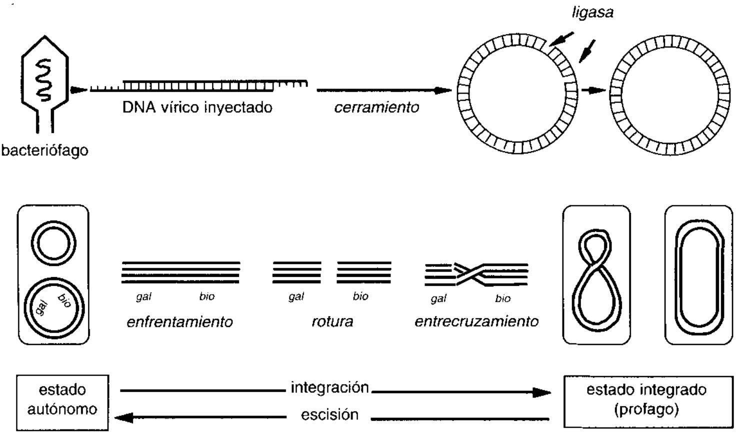


Fig. 4.14 Integración (inserción) del fago lambda en el cromosoma de *Escherichia coli* K12 y su escisión. En la partícula fágica el DNA se presenta en forma lineal de doble cadena con extremos complementarios no apareados. En suspensiones o dentro de la bacteria los extremos complementarios "cohesivos" se acoplan y los huecos se cierran mediante la colaboración de una *ligasa*. La doble cadena circular cerrada se adosa entonces al cromosoma (entre los genes *gal* y *bio*), ambas cadenas dobles se rompen y vuelven a unirse pero con la doble cadena enfrentada. Por enfrentamiento, rotura y nueva unión cruzada tiene lugar la incorporación (inserción o integración) del DNA fágico en el cromosoma del hospedador. El fago se convierte en un profago y la célula es lisógena para el fago lambda. La escisión del DNA de lambda y el paso al estado autónomo también puede suceder por el camino inverso.

En las células lisógenas el profago está fuertemente unido al cromosoma del hospedador; en experimentos de conjugación el profago se transmite conjuntamente con el cromosoma del hospedador desde la célula dadora a la receptora. Experimentos genéticos demuestran que el fago lambda tiene que estar unido al (o junto) al cromosoma del hospedador en un punto muy preciso (entre el operón galactosa y la región biotina). Inicialmente se aceptó que el DNA del profago se fijaba a este lugar del cromosoma bacteriano. Por mapado de las características del fago y por experiencias de recombinación quedó claro que el DNA del fago en la lisogenia no quedaba sólo adherido, sino que se insertaba en el DNA bacteriano.

La **inserción** del DNA del fago en el cromosoma del hospedador tiene lugar aparentemente por anclaje, rotura y unión cruzada (Fig. 4.14). El enzima responsable de esta reacción es la *integrasa de lambda*. Reconoce las dos secuencias de DNA no homólogas, distintas, una en el DNA cromosómico y otra en el DNA fágico. Junta íntimamente a las dos dobles cadenas. Ambas dobles cadenas se rompen y se vuelven a juntar de forma cruzada. Cada una de las fases de esta recombinación de lugar específico pueden verse en la figura 4.14.

En el estado integrado el DNA fágico se replica conjuntamente con el DNA bacteriano y está sometido a la misma regulación que la replicación del cromosoma bacteriano. La información contenida en el DNA del fago no se manifiesta. Únicamente al pasar el profago al estado vegetativo se restablece la autonomía del DNA fágico y se establece la multiplicación fágica. Este retorno puede ser espontáneo o tener lugar por inducción (p. ej. irradiación con UV). La **escisión del DNA fágico** del DNA bacteriano se realiza probablemente siguiendo a la inversa los pasos de la inserción. La escisión del DNA fágico es por lo general muy precisa: más del 99% de las partículas fágicas producidas por células lisógenas son idénticas al fago infeccioso original. Esto significa, que el DNA del fago al escindirse se rompe exactamente en el mismo punto de la integración. Sólo en raras ocasiones (una entre 100 000) tiene lugar una escisión anormal (véase Transducción).

Si el profago pasa al estado vegetativo después de la escisión, entonces alcanza de nuevo su autonomía y puede reproducirse en la célula bacteriana como un fago virulento. La escisión conduce, por tanto, a la lisis de la bacteria y a la liberación de fagos lambda.

4.3 Relación entre virus y plásmidos con la formación de tumores

La formación de tumores malignos (cáncer) puede tener diversos orígenes, pero siempre participa el material hereditario de la célula, el DNA. Cualquiera que sea la causa que conduzca a la formación del tumor, éste está ocasionado por el DNA de la célula que tiene un crecimiento descontrolado. La transformación de una célula normal en otra tumoral se basa en la transferencia o reorientación del DNA. El agente que determina la multiplicación celular es un producto génico. No obstante, aún no puede establecerse de una forma general una teoría de la desdiferenciación cancerígena para todos los tipos, pero la investigación de la transferencia de los tumores desencadenados por virus y plásmidos permite amplias conclusiones.

A continuación nos ocuparemos de tres ejemplos de formación de tumores: (1) formación de tumores vegetales, (2) formación de tumores en animales por virus DNA, (3) formación de tumores en animales por virus RNA (retrovirus).

Formación de tumores en plantas. En muchas plantas se presentan tumores, las llamadas agallas de las raíces, tumores radicales o cáncer vegetal. Estos tumores hacen disminuir el flujo de nutrientes en la planta. La lesión puede desencadenarse experimentalmente en muchas plantas.

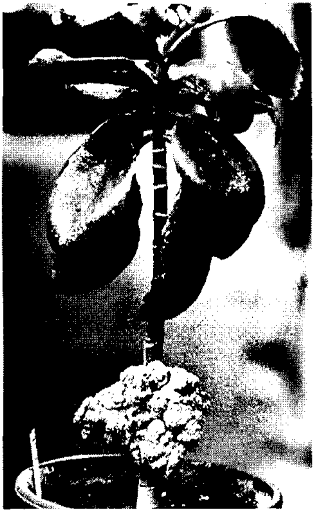


Fig. 4.15 Cáncer vegetal en el tallo de *Kalanchoë blossfeldiana*. La formación del tumor se desencadenó por inyección de *Agrobacterium tumefaciens* en la corteza (Foto U. Kaiser).

Los tumores típicos (Fig. 4.15) se provocan por la infección con *Agrobacterium tumefaciens*, una bacteria del suelo de flagelación peritrica, Gram negativa, semejante al género *Rhizobium*. La infección tiene lugar por la penetración de las bacterias a través de heridas o lesiones; las bacterias se reproducen en los espacios intercelulares. Existen cepas bacterianas virulentas y avirulentas. Las cepas virulentas de *A. tumefaciens* contienen un plásmido grande, el llamado Ti (inductor de tumores).

El verdadero agente infeccioso es el DNA plasmídico. Penetra en la célula vegetal y se incorpora al genoma de la planta. A este proceso se le denomina **transformación oncogénica**. Por transferencia de las células transformadas mediante estaquillas a tejidos sanos pudo demostrarse que las bacterias no son imprescindibles en la comunicación de esta propiedad. No se integra todo el plásmido, sino tan sólo una parte del DNA plasmídico, en el DNA del hospedador. Este fragmento lleva la información para la síntesis de las **opinas**. Son compuestos derivados de la arginina. Los sintetiza la célula vegetal, pero no los puede utilizar, sino que los utiliza *A. tumefaciens*. Así *Agrobacterium*, con ayuda del plásmido Ti, adquiere un acceso exclusivo a los productos fotosintéticos del vegetal. Otros genes Ti afectan a la formación de **auxinas** y **citoquinina**, que estimulan la división de la célula vegetal y el crecimiento del tumor.

La capacidad natural del plásmido Ti para introducir en la célula vegetal DNA bacteriano heterólogo, abrió la posibilidad de utilizar este plásmido como vector para incorporar DNA exógeno en los vegetales. Mediante mecanismos de recombinación de DNA (apartado 15.5, Técnica de clonación) puede integrarse en el plásmido Ti DNA exógeno en lugar de los genes de virulencia, transferirlo, recombinarlo con el genoma de la célula vegetal y por último, expresarlo. De esta forma se consiguieron, por ejemplo, plantas recombinantes de tabaco que sintetizan el sistema de la *luciferasa* y que emiten luz. A otras plantas se les han transmitido características de resistencia frente a antibióticos, herbicidas o insectos perjudiciales. Los intentos de transferencia con mayor éxito se han conseguido con solanáceas (tabaco, patata, *Rauwolfia*, *Petunia*, *Datura*, entre otras). No obstante, la rápida investigación indica ya resultados positivos de la tecnología genética en las monocotiledóneas. El que pueda conseguirse por esta vía la transferencia a plantas de cultivo de la capacidad para fijar N_2 depende en primer lugar de la extremada sensibilidad del sistema de la *nitrogenasa* frente al oxígeno.

Formación de tumores en animales por virus DNA. La investigación de la oncogénesis en animales se realiza generalmente en cultivos celulares. Si se incuban células tisulares, por ejemplo a partir de órganos de gallos o hámsters, o bien fibroblastos humanos en un medio nutritivo adecuado, las células se multiplican sobre la pared interior del recipiente de cultivo. En general sólo crecen hasta que entran en contacto; se da una inhibición por contacto y se forma únicamente una monocapa celular. Si estas células sanas se infectan con un virus tumoral se pierde la inhibición de contacto y las células se superponen. Este crecimiento en varias capas se da sólo en células cancerosas. Las células pueden aislarse fácilmente y obtenerse así líneas puras (clones) de células "oncogénicas transformadas". El crecimiento incontrolado de las células puede conducir en el cuerpo animal a la formación de **tumores**. Si el cuerpo encapsula a estos nuevos tejidos, se habla de un tumor **benigno**, pero si crecen incontroladamente y se diseminan a otras partes del cuerpo o tejidos y determinan una metástasis, entonces se habla de tumores **malignos** o de **cáncer**.

Introducimos aquí al virus de simios 40 (Simian Virus 40, SV40) como ejemplo de la formación de tumores en animales por virus DNA de doble cadena. Afecta a varios hospedadores y tejidos; a ello se refiere la denominación del grupo poliomavirus (-oma indica tumor). Pertenece a los virus tumorales mejor estudiados y se comprobó también su capacidad para utilizarlo como vector en la modificación genética de células animales. El SV40 es un virus icosaédrico sencillo, desnudo (72 capsómeros) y contiene una molécula circular cerrada de DNA de doble cadena. El virus puede transferirse de su hospedador (hámster, rata) a cultivos de tejidos y en ellos se multiplica. En algunas líneas celulares (células permisivas) se multiplica de forma lítica y las células mueren durante la multiplicación celular. En otras líneas celulares (no permisivas) el virus puede establecerse en forma lisógena y no se multiplica. En algunos casos (10^{-5}) el DNA del virus se integra establemente en el DNA de la célula hospedadora. La célula modificada genéticamente puede transformarse en oncogénica, y como consecuencia de un crecimiento descontrolado conducir a la formación de un tumor. En la célula transformada se sintetiza una proteína (antígeno T) que dirige la replicación del DNA celular. La inyección en animales de estas células transformadas conduce a la rápida formación de tumores. La transformación oncogénica por un virus como el SV40 tiene muchos puntos en común con la integración del fago lambda en el genoma bacteriano de *E. coli* (establecimiento de la lisogenia). No obstante, la inserción de SV40 puede tener lugar en muchos lugares del DNA de la célula, y no es por tanto una recombinación específica de lugar. Existen también otros mecanismos de oncogénesis por virus DNA.

Formación de tumores por retrovirus. En la formación de tumores en animales también pueden participar virus RNA. Los retrovirus pertenecen a los virus RNA con envuelta. Contienen un genoma de RNA (+), esto es, RNA de una cadena. Como virus oncogénicos, desencadenan por ejemplo el sarcoma de Rous en aves o la leucemia en ratones. La denominación de retrovirus se basa en que en su multiplicación participa la *transcriptasa inversa* (*reverse transcriptase*) (véase pág. 43). La multiplicación del

RNA de estos virus no puede darse simplemente por replicación del RNA, sino que primero tiene que darse una transcripción en DNA y éste integrarse en el cromosoma de la célula hospedadora. La integración es un paso imprescindible para la multiplicación vírica; únicamente se transcribe el DNA vírico integrado. La frecuencia de la integración es también muy alta porque la integración en el DNA del hospedador forma parte del ciclo vital del virus. Probablemente la integración se puede dar en cualquier lugar del DNA hospedador. La replicación de un RNA de una cadena, un RNA (+) se realiza en los siguientes pasos (Fig. 4.16): transcripción reversa mediante la *transcriptasa inversa* propia del virus en una cadena de DNA complementaria, copia del DNA por la *DNA-polimerasa* celular a una molécula de doble cadena lineal, circularización de la doble cadena (así se establece la forma llamada covalente, cerrada y cir-

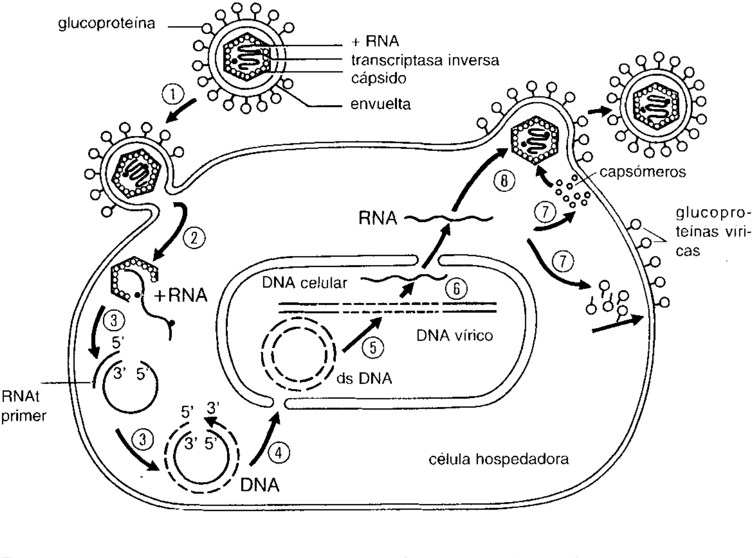


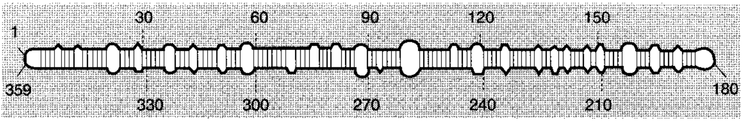
Fig. 4.16 Ciclo de desarrollo de un retrovirus. La partícula vírica se compone de un RNA monocatenario, la *transcriptasa inversa* (*DNA-polimerasa* RNA-dependiente), la proteína del cápsido y de la envuelta; se adsorbe a receptores específicos de la célula hospedadora. El nucleocápsido se capta por un mecanismo semejante a la pinocitosis (1) y se libera el RNA (2). La *transcriptasa inversa* sintetiza una copia de DNA del RNA del virus (3). Tras la síntesis del DNA bicatenario (4) y replicaciones sucesivas el DNA se puede integrar en el genoma de la célula (5). El RNA sintetizado en el núcleo actúa como RNAm (6) para la síntesis de las proteínas del cápsido o de glucoproteínas, pero también como RNA del virus (7). Después de la reunión de las diversas partes (8) el nucleocápsido queda envuelto y se libera por exocitosis.

cular; ccc), integración en el genoma del hospedador, transcripción del DNA vírico en RNAm y en RNA vírico, inclusión en cápsidos y englobamiento de las partículas víricas al gemar a través de la membrana citoplasmática. La multiplicación vírica no es lítica y no tiene como consecuencia la muerte celular.

El DNA integrado de los retrovirus se replica con el genoma de la célula hospedadora (en el sarcoma). Se encuentra, por tanto, en todas las células del sarcoma. El desarrollo oncogénico, la formación del tumor, se basa en la expresión del gen vírico "src". Este gen codifica para una kinasa que fosforila proteínas. La secuencia de bases del gen vírico src es semejante a la secuencia de un gen de la célula hospedadora, cuyo producto tiene un papel en la regulación del crecimiento de la célula normal. Esto lleva a la conclusión de que los genes oncogénicos de los retrovirus tienen un origen celular y que fueron captados en algún momento de los animales en los que los retrovirus se multiplican normalmente ¿Cómo puede interpretarse la acción perjudicial de los genes oncogénicos víricos, cuando se trata tan sólo de copias de genes celulares normales? Una hipótesis dice que los genes oncogénicos víricos se diferencian muy poco de sus predecesores –aunque muestren actividades enzimáticas similares– y en la célula afectan a distintas dianas. En contraposición a esta "hipótesis mutacional" la "hipótesis de dosis" basa la oncogénesis por retrovirus en una sobredosis y no en cualquier propiedad especial de la proteína vírica.

La "teoría del oncogén" puede aplicarse actualmente a todos los virus tumorales. Cada oncogén de un virus tumoral procedería de un gen normal de células animales. Los productos génicos están implicados en la regulación, crecimiento y diferenciación de las células animales.

Viroides. Recientemente se ha demostrado que pequeñas moléculas de DNA desnudo, sin cubiertas proteicas, pueden ser causantes de algunas enfermedades vegetales. Se las denomina viroides. Se trata de una molécula de RNA de una sola cadena cerrada y circular con una longitud de la cadena de aproximadamente 360 nucleótidos (masa relativa: $12 \cdot 10^4$).



Son, por tanto, diez veces menores que el DNA infeccioso del virus más pequeño conocido, y por eso los patógenos más pequeños. Causan enfermedades en la patata, en cítricos, pepinos, crisantemos, lúpulo, cocotero y otras plantas.

Priones. Los agentes causantes de enfermedades como la de CREUTZFELD-JAKOB del hombre o el scrapie de ovejas siguen siendo en gran parte una incógnita. Se ha de tratar de pequeñas proteínas sin ácido nucleico de unos 250 aminoácidos. Probablemente activan a un gen latente del hospedador, que causa la enfermedad y al mismo tiempo codifica para la formación de dicha proteína.

4.4 Virus patógenos humanos importantes

El **constipado** nasal y la gripe son las enfermedades más corrientes entre los resfriados. Los causantes son virus RNA que afectan a las vías respiratorias superiores. Se transmiten de hombre a hombre por gotitas infecciosas. Los síntomas del constipado (rinitis, inflamación de las mucosas de la cavidad nasofaríngea) se desencadenan por **rinovirus**, que son siempre virus desnudos, de RNA monocatenario (picorna y coronavíridos). Se multiplican en las células de las mucosas y las mata. La temperatura óptima para su desarrollo son 33°C. Ésta es precisamente la temperatura de los epitelios de la cavidad nasal. El que no se desarrolle prácticamente una inmunidad frente al constipado se basa con toda seguridad en el gran número de serotipos de los rinovirus.

Los virus de la gripe (influenza) pertenecen al grupo de los ortomixovirus, que son virus RNA envueltos (pág. 147). Inicialmente la enfermedad es muy semejante al resfriado común, pero la irritación no se limita a la cavidad nasofaríngea, sino que afecta también a los pulmones y al estado general del enfermo. Debido a la fácil transmisibilidad del virus se dan incidencias masivas y epidemias de gripe. La pandemia de 1957 se atribuye a la aparición de un virus mutante especialmente virulento, para el que en ningún lugar había una inmunidad previa. La inmunidad contra las proteínas del cápsido o de la envuelta del virus de la gripe puede perdurar varios años. No obstante, como consecuencia de la penetración de varias partículas víricas en una misma célula puede darse un intercambio y reorganizaciones de los antígenos ("antigenic shift"), por lo que el virus se vuelve resistente frente a los anticuerpos producidos previamente y se puede multiplicar en el individuo que antes era inmune.

El virus de la gripe, los rinovirus (constipados) y el **virus de la inmunodeficiencia humana (HIV)** son los más conocidos por el público. En este último caso no se debe a su frecuencia, sino a las consecuencias fatales de la enfermedad que produce, el **SIDA (AIDS)**. El SIDA (Síndrome de la Inmunodeficiencia Adquirida) se puso de manifiesto como una enfermedad del sistema inmunitario porque la infección con HIV va acompañada por infecciones con oportunistas típicos. Las infecciones con oportunistas como *Pseudomonas aeruginosa*, algunos protozoos, levaduras y otros hongos, no se dan en personas con un sistema de defensa inmunitario normal. Los oportunistan afectan exclusivamente a individuos debilitados y se instauran cuando fallan los mecanismos de defensa centrales del organismo.

El HIV es un **retrovirus**, y como tal, su multiplicación requiere la integración de su genoma en el del hospedador (pág. 164 y Tab. 4.1). El HIV es un virus linfotrópico que infecta específicamente a los linfocitos T4. Éstos no son productores de anticuerpos, pero tienen un papel importante como células "helper" de los linfocitos B productores de anticuerpos. Tienen una función esencial en la defensa inmunitaria. En las víctimas del SIDA no se pueden detectar prácticamente linfocitos T4. El HIV inactiva así un elemento esencial de la cascada de la formación de anticuerpos y de la defensa inmune, y hace que el organismo sea sensible a cualquier enfermedad infecciosa y a la formación de tumores.

El que las enfermedades víricas se cuenten actualmente entre las enfermedades infecciosas más frecuentes resulta comprensible. Las bacterias ofrecen más puntos débiles sobre los que puede actuar la terapia para impedir su desarrollo. Por el contrario, la multiplicación de los virus está tan íntimamente unida a procesos fisiológicos esenciales centrales, la síntesis de ácidos nucleicos, que no puede impedirse la multiplicación de los virus sin lesionar seriamente el metabolismo de la célula hospedadora. El éxito en el desarrollo de medios antivíricos es proporcionalmente bajo, y contra los resfriados únicamente sirven los medios caseros clásicos: ¡salud!

5. Los hongos (Fungi = Mycota)

La denominación de hongos proviene de sus representantes más sobresalientes, los hongos que tienen sombrerillo (griego, *mykes;* latín, *fungus).* Son organismos eucariotas y presentan en común con las plantas la posesión de una pared celular, de vacuolas llenas de jugo celular y de una corriente plasmática bien observable así como la incapacidad de moverse. No presentan sin embargo pigmento fotosintético alguno y son C-heterótrofos (quimioorganoheterótrofos). Crecen en condiciones aeróbicas y obtienen la energía por oxidación de materia orgánica. Si se comparan con las plantas diferenciadas en raíz, tallo y hojas (cormo) los hongos presentan sólo un grado muy bajo de diferenciación y en ellos casi no se da la división del trabajo.

Cuerpo vegetativo. El cuerpo vegetativo es un talo. Consiste en filamentos de unos 5 µm de diámetro que se ramifican repetidamente y que se extienden por la superficie o por el interior del sustrato. Los filamentos o **hifas** están formados por la pared celular y el citoplasma con sus inclusiones. Las hifas pueden estar separadas en células mediante paredes transversales (septos) (hongos superiores) o carecer de paredes transversales (hongos inferiores). Incluso en las hifas septadas el citoplasma de una célula está en conexión con el de las vecinas por un poro central existente en el septo (Fig. 5.1).

Al conjunto de hifas del talo de un hongo se le denomina **micelio**. En determinados estadios, a menudo en el paso a fases de multiplicación asexual a sexual, el micelio forma conjuntos de aspecto tisular denominados **plecténquimas**. La "carne" de las setas constituye un plecténquima típi-

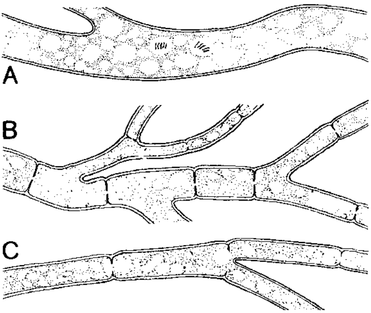


Fig. 5.1 Hifas somáticas de los hongos. A Las hifas de los ficomicetos carecen de paredes transversales o septos; **B** Las hifas septadas son características de los eumicetos; **C** Las hifas de *Leptomitus lacteus* (oomiceto) presentan estrechamientos debidos a estrangulaciones locales.

co. En los hongos superiores el micelio forma también gruesos filamentos, rizomorfos, algunos de los cuales participan en el transporte de sustancias.

Reproducción y multiplicación. Las hifas de los hongos crecen por el extremo (crecimiento apical). En la mayoría de hongos cualquier parte del micelio puede crecer; para sembrar resulta suficiente un pequeño trozo de micelio para que crezca un talo nuevo. Las formas y los mecanismos de multiplicación son extraordinariamente numerosos y constituyen la base de la clasificación de los hongos. Pueden distinguirse dos tipos de reproducción: la sexual y la asexual. Los hongos se multiplican por lo general de ambas formas.

La **reproducción asexual** de los hongos se efectúa por lo general mediante la formación de esporas, por gemación o por fragmentación. La **formación de esporas** es la forma más extendida y la más altamente diferenciada. Las **conidiósporas** se forman por estrangulación del extremo de las hifas (*Penicillium, Aspergillus*). Si se forman en el interior de receptáculos, los esporangios, se habla de **esporangiósporas** (*Mucor, Rhizopus*). Las esporangiósporas de los hongos inferiores presentan a menudo flagelos y se denominan zoósporas. Los flagelos siguen el plan general típico de los eucariotas; surgen en el citoplasma de un blefaroplasto y están formados por once fibrillas paralelas, nueve de las cuales se disponen en la periferia de forma concéntrica alrededor de las dos fibrillas centrales (9 + 2).

La forma típica de reproducción asexual de las levaduras es la **gemación**; se forma una excrecencia en la célula madre a la que pasa un núcleo. Esta excrecencia se estrangula y forma una gémula (Fig. 5.2). La multiplicación puede también efectuarse por rotura de las hifas en células individuales, los oídios o **artrósporas** (por ejemplo en *Endomyces lactis).* Estas células se hallan rodeadas en algunos hongos de una pared gruesa y se denominan **clamidósporas**. Finalmente algunas levaduras (*Schizosaccharomyces*) se multiplican por división binaria, típica de las bacterias.

La **reproducción sexual** supone como en el resto de los eucariotas la unión de dos núcleos. Esta fusión de los núcleos tiene lugar en distintos hongos tan sólo después de transcurrido un intervalo de tiempo de longitud variable después de haberse producido el primer contacto entre las células paternas implicadas. Pueden distinguirse tres fases en la reproducción sexual: primeramente se produce la **plasmogamia**, o unión de los protoplastos. La célula resultante presenta dos núcleos. Estos dos núcleos o dicarion no necesitan fusionarse en seguida sino que pueden permanecer en estado dicariótico durante toda la división celular. Los núcleos se dividen pues de forma simultánea (división conjugada). Tan sólo después, a menudo tras la formación de un cuerpo fructífero, se forma por fusión de los dos núcleos haploides (**cariogamia**) el núcleo zigótico diploide. A la cariogamia le sigue la **meiosis**, esto es la reducción del número de cro-

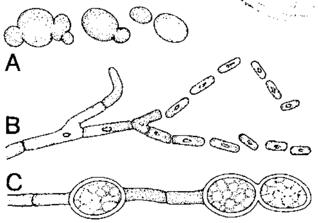


Fig. 5.2 Reproducción asexual de algunos hongos. A Por gemación (levaduras); **B** Por ruptura de las hifas en células aisladas, denominadas oídios o artrósporas, por comportarse como esporas (*Collybia* spec.); **C** Por formación de pared gruesa, clamidósporas (*Fusarium*) (según Alexopoulos, C.J.: Einfuhrung in die Mykologie, Fischer, Stuttgart 1966).

mosomas al número primitivo (haploide). Los tres procesos mencionados, plasmogamia, cariogamia y meiosis, se producen en algunos hongos inmediatamente uno después del otro, en otros se producen, sin embargo, en estadios completamente distintos del desarrollo del hongo.

En los hongos inferiores se inicia la fase de reproducción sexual mediante la formación de células sexuales o **gametos**. Si los gametos procedentes de las células maternas masculinas y femeninas no se diferencian morfológicamente entre sí, se habla de isogametos. Los gametos se forman a menudo en células morfológicamente diferenciadas, los **gametangios**. Si los gametangios se diferencian morfológicamente entre sí se habla de los gametangios masculinos como de **anteridios** y de los gametangios femeninos como de **oogonios**.

En lo referente al tipo de **transferencia de los gametos** y de plasmogamia pueden diferenciarse varios tipos. En los hongos inferiores predominantemente acuáticos ambos gametos son móviles (planogametos) y se fusionan fuera del gametangio. En los oomicetos sólo el gameto masculino es móvil; se introduce en el oogonio y fecunda a la ovocélula. La **gametangiogamia** o fusión de los gametangios multinucleados completos para formar un **cenozigoto** es característica de los zigomicetos.

Si en un mismo cuerpo vegetativo procedente de una sola espora se forman los gametangios masculinos y femeninos se habla de hongos monoicos (homotálicos o hermafroditas). En los hongos dioicos (heterotálicos) los talos de los distintos sexos son diferentes y son portadores tan sólo de órganos sexuales masculinos o femeninos. En los hongos homotálicos puede producirse autofecundación (autogamia). Cuando algún tipo de impedimento fisiológico evita la autofecundación se habla de **incompatibilidad**. Se presenta por ejemplo en *Neurospora*. Si bien en *Neurospora* se forman en un mismo talo gametangios de ambos sexos, sólo puede producirse la fecundación entre tipos distintos de cruzamiento (+ y –). Los individuos del mismo tipo de cruzamiento son incompatibles.

Clasificación. Los fines de la clasificación de los hongos –como los de las bacterias– son predominantemente prácticos, si bien también tienen en cuenta las relaciones filogenéticas. La nomenclatura es binomial: el nombre de cada especie está formado por un nombre genérico y otro específico (por ejemplo, *Aspergillus niger*). Las especies se agrupan en géneros, los géneros en familias (*-aceae*), las familias en órdenes (*-ales*) y los órdenes en clases (*-mycetes*). La denominación *Mycota* o *Fungi,* esto es hongos por antonomasia, incluye a los mixomicetos u hongos mucosos verdaderos, los ficomicetos u hongos inferiores y los eumicetos u hongos superiores.

El lector puede encontrar una visión completa de la taxonomía, morfología y fisiología de los hongos en una serie de manuales: MÜLLER y LÖFFLER, GAUMANN, ALEXOPOULOS, VON ARX, WEBSTER y otros. El micólogo y el microbiólogo interesados preferentemente en un grupo concreto de hongos tienen que dirigirse a esas obras. Aquí sólo podemos presentar algunos representantes de los distintos grupos que sean sistemas modelo en la investigación o bien que presenten un gran interés práctico (Tab. 5.1).

5.1 Acrasiomicetos (hongos mucosos celulares)

Los acrasiomicetos se denominan también hongos mucosos celulares para contraponerlos a los hongos mucosos verdaderos que forman plasmodios. La denominación de “amebas sociales” se debe a la curiosa formación de cuerpos fructíferos bien proporcionados a partir de un gran número de amebas socializadas. Debido al parecido externo existente entre los cuerpos fructíferos de los mixomicetos y de los acrasiomicetos se han representado conjuntamente los ciclos biológicos en la figura 5.3.

A los acrasiomicetos pertenecen aproximadamente una docena de especies que viven libremente en el suelo. Los mejor estudiados son *Dictyostelium mucoroides* y *D. discoideum.* Pueden aislarse fácilmente en los suelos ricos en humus. En los cultivos puros obtenidos en agar nutritivo o en medios de cultivo líquidos las amebas se alimentan de bacterias, sobre todo de *Escherichia coli* o de *Enterobacter aerogenes* en los trabajos experimentales.

Ciclo biológico (Fig. 5.3A). Las unidades básicas de los acrasiomicetos consisten en amebas desnudas, uninucleadas y haploides. Las amebas se desplazan por el agar emitiendo pseudópodos, se alimentan por fagocitosis de células bacterianas y se multiplican. Poco después se desplazan a un centro de agregación y forman un plasmodio de agregación; este plasmodio se denomina también pseudoplasmodio a fin de contraponerlo al plasmodio multinucleado pero unicelular de los mixomicetos. Si bien las amebas conservan su individualidad, el pseudoplasmodio funciona como un todo. Forma un montículo en el que se diferencia el eje del cuerpo fructí-

Tabla 5.1 Visión de conjunto de algunos de los grupos más importantes de hongos (Fungi o Mycota).

Mixomicetos verdaderos = **Mixomicetos**	Hongos inferiores = **Ficomicetos**	Hongos superiores = **Eumicetos**		
Fuligo septica *Lycogala epidendron* *Cribraria rufa* *Physarum*	Quitridiomicetos Quitridiales Blastocladiales Monoblefaridales Oomicetos Saprolegniales Leptomitales Peronosporales Plasmodioforomicetos Zigomicetos Mucorales Entomoftorales	Hongos con ascas = **Ascomicetos**	Hongos erectos = **Basidiomicetos**	Hongos imperfectos = **Deuteromicetos**
Mixomicetos celulares = **Acrasiomicetos** *Dictyostelium*		Protoascomicetos Endomicetáceas Sacaromicetáceas Euascomicetos Plectomicetos (= hongos con cleistotecio) *Aspergillus* *Penicillium* Pirenomicetos (= hongos con peritecio) *Sordaria* *Neurospora, Xylaria* *Nectria, Claviceps* Discomicetos (= hongos con apotecio) *Rhytisma, Peziza* *Helvella, Morchella* *Tuber*	Heterobasidiomicetos Tremelales Uredinales Ustilaginales Homobasidiomicetos Himenomicetos Poliporáceas Agaricáceas Boletáceas Hidnáceas Clavariáceas Corticiáceas Gasteromicetos Licoperdales Falales Nidulariales	*Aspergillus* *Penicillium* *Phoma* *Monilia* *Candida* *Alternaria*

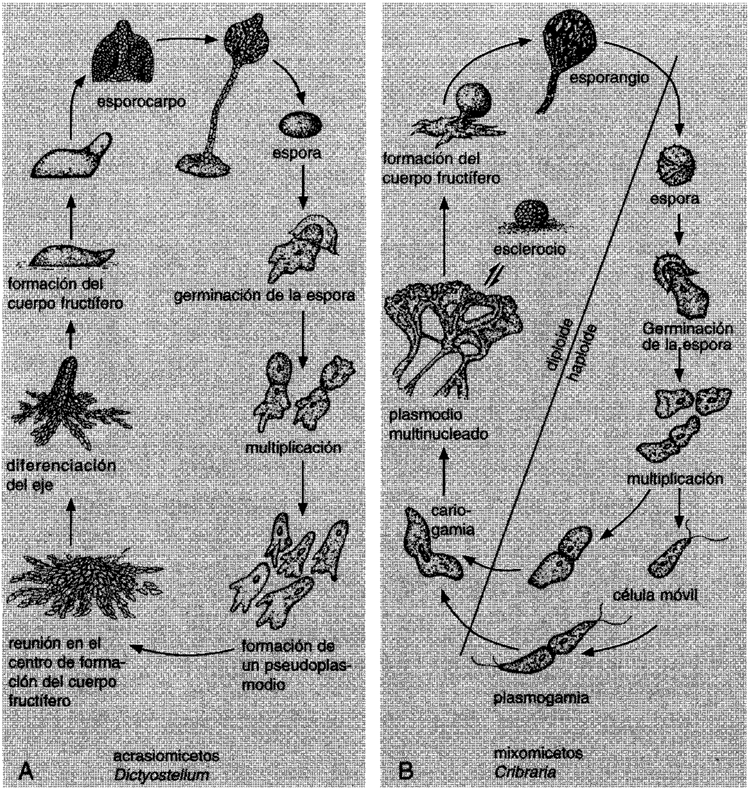

esporocarpo
espora
germinación de la espora
multiplicación
formación de un pseudoplasmodio
reunión en el centro de formación del cuerpo fructífero
diferenciación del eje
formación del cuerpo fructífero
A
acrasiomicetos
Dictyostelium
esporangio
espora
Germinación de la espora
multiplicación
célula móvil
plasmogamia
cariogamia
plasmodio multinucleado
esclerocio
formación del cuerpo fructífero
diploide
haploide
B
mixomicetos
Cribraria

Fig. 5.3 Ciclos de desarrollo de los acrasiomicetos y mixomicetos formadores de cuerpos fructíferos. A Ciclo de desarrollo de un acrasiomiceto (*Dictyostelium*). Las amebas desnudas uninucleadas forman un plasmodio de agregación; a partir de él se diferencian un pedúnculo y una cabezuela formando un cuerpo fructífero. **B** Ciclo de desarrollo de los mixomicetos. Las mixamebas se reúnen en un plasmodio multinucleado del que surgirá el cuerpo fructífero.

fero, el soróforo. Las células superiores se convierten en células pedunculares; el pedúnculo es rodeado por una capa de celulosa. Las células posteriores se dirigen hacia el extremo superior del pedúnculo, se disponen en forma de una cabezuela esférica y se convierten en esporas; estas últimas son amebas enquistadas. Durante la germinación de las esporas se forma un poro en la pared de celulosa a través del cual sale la ameba. A partir de allí vuelve a iniciarse el ciclo biológico.

El estadio de nutrición se diferencia claramente de la fase morfogenética. La captación de alimento se detiene poco antes de producirse la agregación. Puede posponerse durante cierto tiempo la agregación añadiendo bacterias que sirvan de alimento. El ciclo de los acrasiomicetos constituye un ejemplo clásico de la formación de una estructura individual a partir de cierto número de células independientes entre sí. La "orden superior" o "el dios de las amebas" que desencadena la agregación y la formación de los cuerpos fructíferos parece ser una sustancia difusible denominada "acrasina". En el caso de *Dyctiostelium discoideum* la acrasina es idéntica al adenosinmonofosfato cíclico (adenosín-3',5'-fosfato).

5.2 Mixomicetos (hongos mucosos verdaderos)

Los mixomicetos son eucariotas pertenecientes al grupo de los hongos. En su ciclo biológico forman también cuerpos fructíferos análogos externamente a los de las mixobacterias y de los acrasiomicetos pero notablemente mayores. En la imagen comparativa ya se ha presentado su ciclo biológico (Fig. 5.3B). Viven en los lugares húmedos del bosque, sobre hojas muertas, en la madera, en la corteza de los árboles, en las vallas viejas, etc. Los cuerpos fructíferos de 0,5 hasta 1 cm de tamaño, en parte con colores vistosos, resultan fáciles de ver. Los cuerpos fructíferos jóvenes de *Lycogala epidendron* del tamaño de una cereza son prácticamente de color rojo escarlata. Cuerpos fructíferos pedunculados más pequeños (por ejemplo, *Cribraria rufa)* destacan por la bizarra estructura del esporangio. El plasmodio de la especie amarilla *Fuligo septica* se presenta en masas del tamaño de una mano y de aspecto espumoso en las tenerías, en los tocones de los árboles y en sitios análogos.

Ciclo biológico (Fig. 5.3B). Las esporas liberadas por los cuerpos fructíferos germinan en superficies húmedas y dan lugar a individuos flagelados o **mixamebas.** Se alimentan de sustancias líquidas o fagocitando bacterias, levaduras, esporas de hongos u hongos. Tras un cierto tiempo los **mixoflagelados** pierden sus flagelos y pasan al estadio de amebas. Esas células son uninucleadas. Finalmente se fusionan dos de las mismas (plasmogamia y cariogamia) y forman un mixozigoto. Estas amebas diploides se conservan como tales o bien se fusionan con otras amebas diploides para formar plasmodios verdaderos multinucleados. Cuando las condiciones nutritivas son buenas, el número de núcleos se multiplica por múltiples divisiones mitóticas del núcleo. "Un plasmodio bien proporcionado... puede ser comparado a un río que da lugar en su desembocadura a numerosos brazos, formándose un delta. Este delta es el frente que se desplaza lentamente hacia adelante" (JAHN). Los plasmodios tienen fototaxia negativa y alcanzan los sustratos adecuados por medio de estímulos (hidro- y quimiotaxia). En el movimiento hacia adelante parece participar una proteína parecida a la miosina B (cuya existencia ha sido probada en *Physarum polycephalum*).

De los plasmodios surgen los esporangios o cuerpos fructíferos. La transición a esa fase fructífera se caracteriza fisiológicamente por un cambio en la excitabilidad. Los plasmodios abandonan su situación en lugares oscuros y húmedos y se desplazan hacia zonas iluminadas. Citológicamente puede constatarse una división reductora (meiosis). A continuación tiene lugar la formación de un esporangio de forma más o menos complicada, en cuya parte externa se forma una membrana sólida, el peridio, y en cuyo interior se forman numerosas esporas de pequeño tamaño rodeadas por una membrana y provistas de un solo núcleo. Los restos de plasma que quedan entre las esporas forman una red o armazón llamado capilicio. Al madurar se rompe el peridio y las esporas son liberadas del esporangio mediante corrientes de aire.

5.3 Ficomicetos (hongos inferiores)

Bajo el apelativo de hongos inferiores reunimos a un vasto grupo de hongos cuyos cuerpos vegetativos carecen de septos y son uninucleados por muy ramificadas que puedan estar las hifas; se habla de un talo cenocítico. La mayoría de hongos inferiores forma las esporas en el interior de esporangios. Las formas primitivas adaptadas a la vida acuática forman esporas y gametos móviles. En el tránsito de las formas acuáticas a las formas anfibias y terrestres más evolucionadas sólo se encuentran muy ocasionalmente estadios móviles.

Quitridiomicetos. Los quitridiomicetos son hongos preponderantemente acuáticos; también se encuentran algunos representantes en el suelo. Son microscópicos. La pared celular parece estar formada principalmente por quitina. Muchos de dichos hongos parasitan las algas planctónicas y las plantas acuáticas. *Synchytrium endobioticum* tiene que mencionarse por ser el parásito más importante económicamente de las plantas cultivadas, el causante de los tumores de las patatas. *Rhizophidium pollinis* parasita los granos de polen del género *Pinus* y es una de las especies preferidas para hacer demostraciones.

Oomicetos. Los oomicetos son hongos acuáticos y terrestres que se multiplican asexualmente mediante zoósporas flageladas. *Saprolegnia* y *Leptomitus* son los conocidos "mohos del agua" y viven en el agua. Los peronosporales ya pueden vivir en medio terrestre. Son parásitos obligados cuyo ciclo biológico transcurre totalmente en plantas superiores. No obstante, aún forman zoósporas. Entre ellos se encuentran algunos de los parásitos más devastadores: *Phytophthora infestans* es el causante de la podredumbre seca en las hojas y tubérculos de las patatas y *Plasmopara viticola* es el causante del mildiu de la vid.

Saprolegnia está muy extendido y puede aislarse y cultivarse con facilidad. Poniendo un cebo puede conseguirse fácilmente un cultivo de enriquecimiento: se coloca como cebo una mosca muerta con las alas y las patas bien extendidas en la superficie de una cápsula que se ha llenado con agua de un estanque y al cabo de pocos días la mosca se halla cubierta por hifas y esporangios. Con el microscopio puede seguirse sin ninguna dificultad la formación de los esporangios y el "deslizamiento" de las zoósporas (Fig. 5.4).

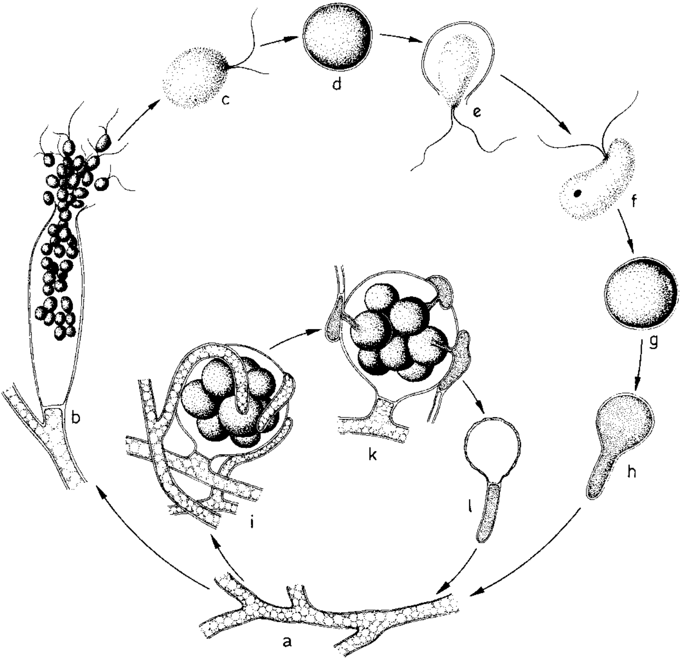


Fig. 5.4 Ciclo biológico de *Saprolegnia* sp. a) Hifa somática, b) esporangio con zoósporas primarias, c) zoóspora primaria, d) zoospóra encapsulada, e) germinación, f) zoóspora secundaria, g) zoóspora encapsulada, h) germinación, i) oogonio con oosferas esféricas y anteridios, k) como en i) pero se presenta el corte transversal de los anteridios con los tubos copuladores introducidos en el oogonio, l) germinación de una oóspora (según ALEXOPOULOS C.J.: Einführung in die Mykologie. Fischer, Stuttgart 1966).

Es interesante la **diplania** existente en *Saprolegnia* y otros géneros próximos. Aparecen consecutivamente dos estados móviles. Las zoósporas primarias que han surgido del esporangio se enquistan después de moverse durante un primer período de tiempo. Estos cistos dan lugar a una segunda zoóspora que a su vez vuelve a encapsularse después de moverse durante un cierto período. Únicamente este cisto forma un tubo germinativo y después hifas.

La **reproducción sexual** se efectúa por contacto directo de los gametangios, esto es, del anteridio con el oogonio. La mayoría de Saprolegniáceas son hermafroditas u homotálicas: los anteridios y oogonios que se unen entre sí se forman en un mismo cuerpo vegetativo. Los oogonios son esféricos, con paredes gruesas y con varias células germinales (oosferas). Los anteridios son más pequeños, se forman en el extremo de las hifas y cuando están maduros se unen, ya sea uno o varios, al oogonio. De los anteridios salen tubos copuladores que atravesando la pared del oogonio se dirigen a las oosferas. Cada uno de los núcleos se dirige a un núcleo femenino y se fusiona con él para formar el núcleo zigótico. Después de la fecundación cada una de las oosferas se rodea de una pared gruesa y se convierte en una oóspora. Después de un período de vida latente bastante largo germina la espora formando un tubo germinativo; en ese momento tiene lugar la división reductora. El ciclo biológico se cierra con la formación de nuevos esporangios.

Zigomicetos. El nombre de zigomicetos se debe al tipo de reproducción sexual, especialmente a la formación de zigósporas. El cenozigoto o zigóspora se forma por fusión de dos gametangios (gametangiogamia) que a modo de puente o yugo (griego, *zygos)* unen entre sí las dos hifas paternas (Fig. 5.6). Los zigomicetos constituyen el grupo de ficomicetos más evolucionado y mejor adaptado a la vida terrestre. Se distribuyen en tres órdenes: mucorales, entomoftorales y zoopagales, si bien aquí sólo se hablará de los primeros.

Los **mucorales** viven en materia orgánica en descomposición; algunos son coprófitos, esto es, su sustrato preferido lo constituyen los excrementos; el estiércol de caballo y el jugo obtenido a partir del mismo ha constituido el sustrato de estudios de gran valor. Nombres como *Mucor mucedo,* el moho blanco del estiércol, *Rhizopus nigricans,* el moho del pan, *R. oryzae, R. arrhizus, R. rouxii, Phycomyces blakesleeanus, Choanephora cucurbitarum, Blakesleea* y otros no sólo son conocidos por los micólogos, sino también por los químicos y los biotecnólogos debido al papel que desempeñan en la industria.

El crecimiento de los hongos es por lo general muy escaso en condiciones anaeróbicas y sólo prosigue durante un período breve. Al terminarse el oxígeno atmosférico los hongos se transforman en fermentadores; muchos hongos forman entonces ácido láctico o etanol. También adoptan **una nueva forma de crecimiento**; *Mucor racemosus* forma en condiciones anaeróbicas un **micelio gemular** y las células jóvenes se reproducen al igual que las levaduras por gemación.

La propagación de las mucoríneas es muy rápida, tanto por medio de las esporangiósporas producidas en gran número como por el rápido crecimiento de las hifas. *Rhizopus stolonifer (= R. nigricans)* forma p. ej. estolones que pueden extenderse a distancias superiores a algunos centímetros.

La **reproducción asexual** se efectúa por formación de esporangios y de esporangiósporas. A partir del micelio con crecimiento exuberante se elevan verticalmente dos ramas laterales, quedan delimitadas por una pared transversal y se hinchan en la parte superior formando una cabezuela. Se separa una zona externa de mucho contenido y una zona interna de escaso contenido; algunas zonas son separadas por una pared celular que se aboveda en el interior del esporangio y que se denomina columela. En la zona externa puede haber cientos o miles de núcleos, alrededor de los cuales se dispone un poco de citoplasma y se convierten en esporangiósporas. Algunas mucoríneas forman pequeños esporangios en esporangióforos ramificados llamados esporangiolos que sólo presentan unas pocas esporas o a veces una sola.

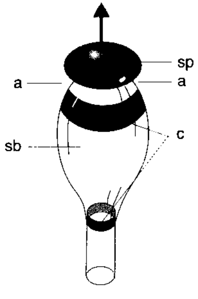


Fig. 5.5 Esporangióforo del Ficomiceto *Pilobolus*. La flecha indica la dirección en que será impulsado el esporangio (sp) tras la ruptura de la vesícula situada debajo del esporangio (sb). c = zona citoplasmática rica en carotenoides; a = zona de ruptura (de NULTSCH, W.: Botánica General, Ediciones Omega, S.A., Barcelona, 1975).

El esporangio de *Pilobolus* tiene una forma algo distinta (Fig. 5.5). La hifa portadora del esporangio se hincha debajo de éste formando una vesícula; esta hinchazón hace que el esporangio se sitúe a modo de gorra. Al aumentar la cantidad de agua en el interior se origina una hipertensión y cuando el esporangio está maduro el esporangióforo se rompe por la columela y lanza el esporangio (incluida la columela) a una altura de hasta 2 m (de ahí el nombre *Pilobolus* = lanzador de proyectiles). *Pilobolus* tiene además muy buena puntería. El esporangióforo presenta fototropismo positivo y crece dirigiéndose hacia la luz, situando por lo tanto al espo-

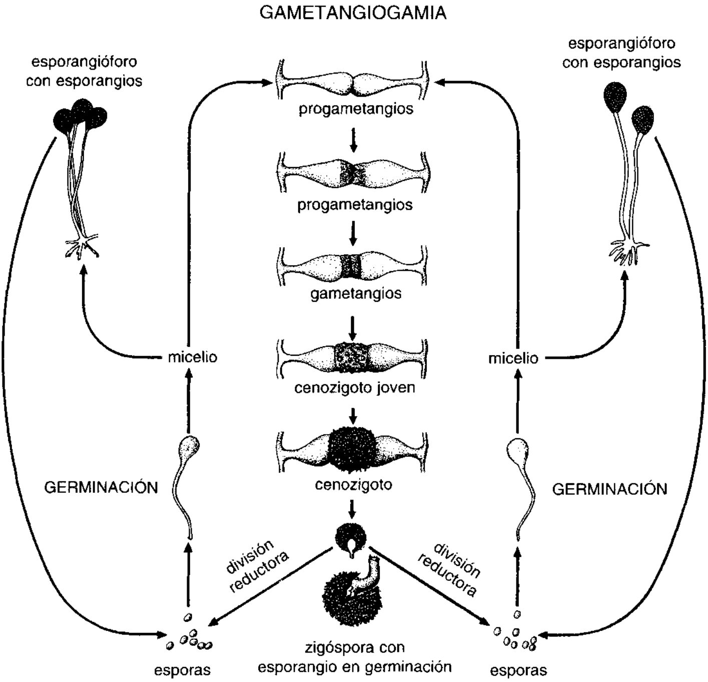

GAMETANGIOGAMIA
esporangióforo con esporangios
esporangióforo con esporangios
progametangios
progametangios
gametangios
cenozigoto joven
cenozigoto
micelio
micelio
GERMINACIÓN
GERMINACIÓN
división reductora
división reductora
esporas
zigóspora con esporangio en germinación
esporas

Fig. 5.6 Ciclo biológico de *Rhizopus nigricans*.

rangio en dirección a la fuente luminosa. *Pilobolus* sólo crece en medios de cultivo con extractos de excrementos. El factor requerido es coprógeno, un factor de crecimiento del grupo de las sideraminas.

La **reproducción sexual** y el **ciclo biológico** se presentan en el caso de *Rhizopus nigricans* (Fig. 5.6). Las esporangiósporas liberadas son plurinucleadas. Germinan en condiciones adecuadas y se forma un micelio aéreo muy ramificado. En aquellos puntos en que los estolones entran en contacto con el suelo se forman rizoides que penetran en el sustrato. A continuación se forman inmediatamente uno o varios esporangióforos. En *R. nigricans* sólo tiene lugar la reproducción sexual cuando se encuentran dos micelios fisiológicamente distintos y compatibles, esto es una cepa (+) y otra (–). Al aproximarse esos dos micelios se forman ramas copuladoras que se hinchan y dan lugar a progametangios que se enriquecen en citoplasma y núcleos y finalmente se separan de las hifas portadoras por la formación de una pared transversal. Las paredes celulares se disuelven en la zona de contacto de los gametangios y los protoplastos se fusionan (gametangiogamia). Se produce el apareamiento de los núcleos (+) con núcleos (–) y la fusión de los mismos. Durante esa fase el cenozigoto aumenta de tamaño y se convierte en una zigóspora de paredes gruesas. Después de un período de reposo se libera la zigóspora y germina mediante un esporangio germinativo, proceso en el que los núcleos sufren una división reductora. El cuerpo vegetativo es pues haploide.

Algunas mucoríneas son homotálicas y pueden autofecundarse.

5.4 Ascomicetos (hongos con ascas)

Los hongos superiores (eumicetos) abarcan a los ascomicetos y basidiomicetos. Es característico de los mismos la posesión de un micelio septado y la formación de conidiósporas. No presentan células flageladas.

La denominación de ascomicetos se debe a la formación tubular característica del grupo, el **asca**, en la que se forman las **ascósporas**. En el asca se realiza la cariogamia y la meiosis. El estadio de asca es la fase final de la reproducción sexual, también llamada forma **perfecta** o **forma principal de multiplicación**. Muchos ascomicetos se reproducen asexualmente mediante la formación de conidios. Esta **forma secundaria** de multiplicación se denomina también estadio **imperfecto**. Hay muchos hongos para los que sólo se conoce el estadio imperfecto, esto es la formación de conidios. Se agrupan bajo el nombre de hongos imperfectos o deuteromicetos.

Ciclo biológico. El tubo germinativo que sale de la ascóspora se desarrolla y forma un micelio (Fig. 5.7). Este micelio produce conidióforos en numerosas formas. Los conidios formados en gran número también germinan y forman micelios, que son iguales a los formados a partir de las ascósporas. Más tarde y en el mismo micelio que ha formado los conidios surgen las ascas. La **fase sexual** se inicia con la formación de ascogonios. El ascogonio presenta una tricógina que recibirá los núcleos masculinos. Estos últimos pasan del anteridio a través de la tricógina al ascogonio (plasmogamia) en donde se produce el apareamiento de los núcleos sin que éstos lleguen a fusionarse. Del ascogonio surgen a continuación las llamadas hifas ascógenas, cada una de cuyas células presenta un núcleo masculino y otro núcleo femenino (hifas dicarióticas). Los núcleos se dividen simultáneamente. La fusión de los dicarios se inicia con una división celular especial, la **formación del uncínulo**. El extremo de las hifas se redondea formando una especie de gancho; la pareja de núcleos sufre una división conjugada. La pareja de núcleos superior se separa tanto del pedí-

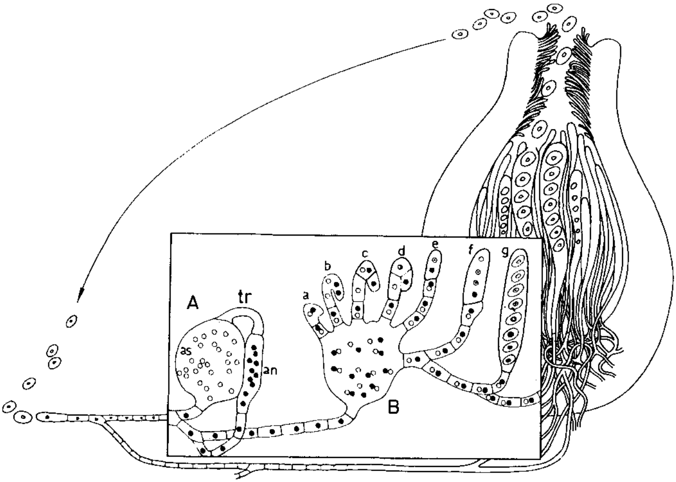
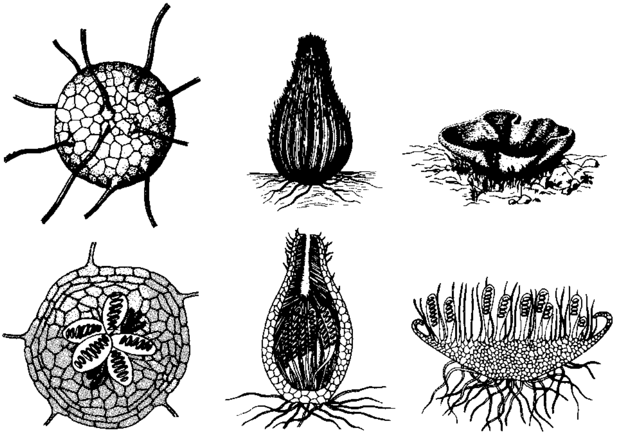


Fig. 5.7 Ciclo biológico de un ascomiceto homotálico. A Ascogonio antes de la plasmogamia; **B** Ascogonio con hifas ascógenas dicarióticas, estadios sucesivos de la formación del uncínulo y del asca: a) formación del uncínulo, b) uncínulo tras la división de la pareja de núcleos, c) pared transversal del uncínulo ya formada, d) cariogamia en el asca y fusión del uncínulo con el pedículo, e, f, g) divisiones del núcleo primario del asca y g) formación de las ocho ascósporas; as = ascogonio, an = anteridio, tr = tricógina.

culo como del uncínulo mediante la formación de paredes celulares. El uncínulo se fusiona con el pedículo, con lo que la célula formada vuelve a presentar una pareja de núcleos. La célula situada arriba y separada con anterioridad se convertirá en el asca. En el asca tiene lugar la fusión de los dos núcleos de dicha célula. Este núcleo primario del asca sufre dos divisiones nucleares siendo una de ellas una meiosis. Los ocho núcleos hijos formarán por división celular libre las ocho ascósporas. El número de divisiones puede ser inferior (4 esporas) o superior (más de 1000 esporas). Tanto las ascósporas como el micelio son pues haploides.

Cuerpos fructíferos. Las ascas se forman –con algunas excepciones– en los cuerpos fructíferos (ascocarpios). Constituyen los recipientes o receptáculos en los que los órganos sexuales alcanzan la madurez. La red de hifas confiere al cuerpo fructífero su forma característica. Se diferencian tres formas (Fig. 5.8): 1. un cuerpo fructífero totalmente cerrado, el **cleistotecio**, característico de los plectomicetos, 2. un cuerpo fructífero ampuliforme, el **peritecio**, típico de los pirenomicetos y 3. un cuerpo fructífero abierto en forma de copa, el **apotecio**, típico de los discomicetos. Además



cleistotecio peritecio apotecio

Fig. 5.8 Imágenes habituales y cortes transversales de los cuerpos fructíferos (ascocarpios) característicos de los plectomicetos (cleistotecio), de los pirenomicetos (peritecio) y de los discomicetos (apotecio).

existen hongos con ascas desnudas (protoascomicetos). En el caso de las trufas (*Tuberales*) los ascocarpios permanecen cerrados.

Levaduras. Entre los protoascomicetos se encuentran las levaduras. La forma de reproducción asexual típica en sentido amplio de las levaduras es la gemación (Fig. 5.2); raramente se efectúa la multiplicación por división transversal (división binaria). Las células resultantes de la gemación pueden permanecer unidas formando un pseudomicelio o bien pueden separarse completamente unas de otras. Las ascósporas se forman en un asca desnuda procedente ya sea de un zigoto ya sea de una célula vegetativa.

Los miembros de la familia endomicetáceas forman además de células aisladas por gemación un micelio. En el género *Endomycopsis* se encuentran juntas hifas, células en gemación y ascas con ascósporas. En *Endomyces lactis* (también llamado *Geotrichum candidum* y *Oospora lactis*) las hifas se convierten en artrósporas, esto es, en células hifales autónomas.

Las sacaromicetáceas o levaduras propiamente dichas (Fig. 5.9 y 5.10) carecen de micelio. La levadura del pan y la de la cerveza son razas fisiológicas de *Saccharomyces cerevisiae*. Las células haploides que se reproducen por gemación pueden fusionarse (copular). Inmediatamente después de la cariogamia puede producirse una meiosis y la formación de cuatro ascósporas. La célula diploide también puede sin embargo multi-

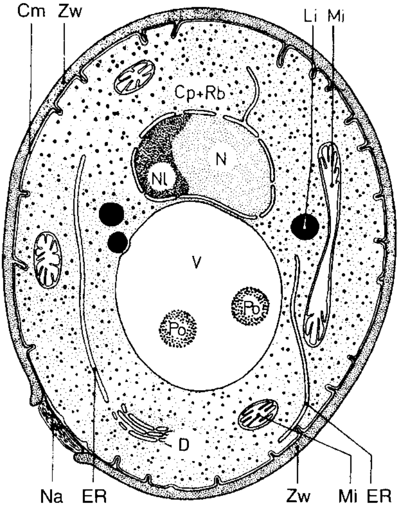

Cm
Zw
Li
Mi
Cp+Rb
N
Nl
V
Po
Po
D
Na
ER
Zw
Mi
ER

Fig. 5.9 Esquema del corte transversal de una célula de levadura. La gemación que ha dado lugar a una célula hija ha dejado una señal. Cm = membrana citoplasmática, Cp = citoplasma, D = dictiosoma, ER = retículo endoplasmático, Li = gotas lipídicas, Mi = mitocondrias, N = núcleo, Na = señal o cicatriz, Nl = nucléolo, Po = polifosfato, Rb = ribosomas, V = vacuola, Zw = pared celular.

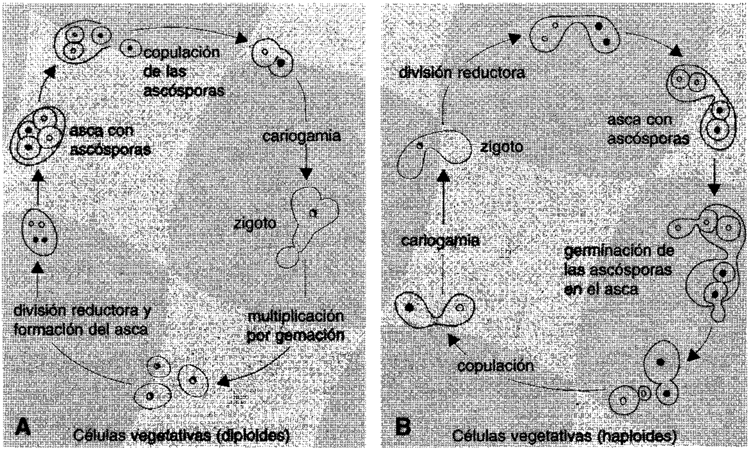

copulación de las ascósporas
asca con ascósporas
cariogamia
zigoto
división reductora y formación del asca
multiplicación por gemación
A
Células vegetativas (diploides)
división reductora
zigoto
asca con ascósporas
cariogamia
germinación de las ascósporas en el asca
copulación
B
Células vegetativas (haploides)

Fig. 5.10 Ciclos biológicos de levaduras. A En *Saccharomyces cerevisiae* (**predominantemente diploide**) la copulación tiene lugar inmediatamente después de la formación de las ascósporas. **B** En *Zygosaccharomyces* (**haploide**) las células haploides vegetativas copulan y la fase diploide se limita al zigoto.

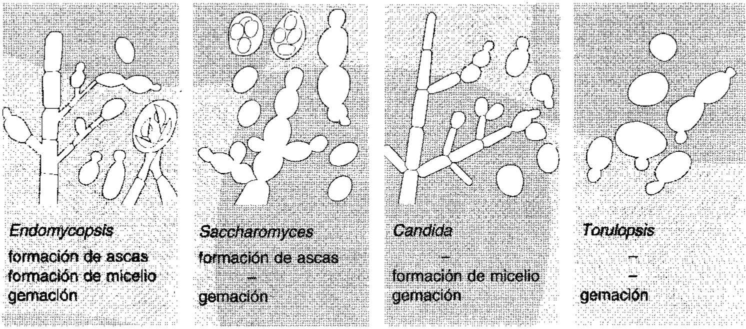


Fig. 5.11 Las levaduras pueden diferenciarse según su capacidad para formar ascas, micelios y para gemar.

plicarse por gemación; es de tamaño superior y fisiológicamente más activa que la célula haploide. En la industria se utilizan preferentemente razas diploides o poliploides. *S. cerevisiae* se ha convertido en un organismo modelo para la investigación en genética molecular de los microorganismos eucariotas debido a su genoma haploide (sólo triplica al de *E. coli*), al bajo número de cromosomas (16 lineales de 200 a 2200 kb), y a los breves tiempos de duplicación de 90 minutos.

Las levaduras asporógenas tienen que ser consideradas levaduras aún más reducidas. Tan sólo unas pocas formas constituyen agrupaciones miceliales, que en la mayoría de los casos sólo se multiplican por gemación. Entre las levaduras asporógenas se encuentran los géneros *Candida*, *Torulopsis*, *Cryptococcus*, *Rhodotorula*, *Pullularia* y otras (Fig. 5.11).

En la naturaleza pueden encontrarse levaduras en todos aquellos puntos en que se liberen jugos fermentables ricos en azúcares: en el néctar de las flores, en los frutos y en las hojas. *Pullularia pullulans* es una levadura del tejo que forma un recubrimiento negro sobre las hojas, cubiertas con cornezuelo.

Plectomicetos. Los plectomicetos son hongos que tienen cleistotecios. Entre los mismos se encuentran dos géneros extraordinariamente importantes: *Aspergillus* y *Penicillium*, que sólo se conocen en su estado conidial (Fig. 5.12). Todavía volverá a hablarse repetidamente de estos hongos en relación con aspectos fisiológicos. El micelio plurinucleado y muy ramificado está cubierto por gran número de conidióforos. Éstos se forman individualmente en las hifas, al ramificarse una célula hifal, la célula pedicular y surgir una hifa vertical. En *Aspergillus* esta célula termina con una vesícula en cuya superficie se forman los esterigmas. Sobre los este-

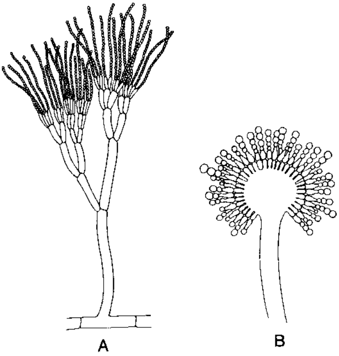


Fig. 5.12 Figuras secundarias de fructificación de los plectomicetos. A *Penicillium*; **B** *Aspergillus* (de Nultsch, W.: Botánica General, Ediciones Omega, S.A., Barcelona 1975).

rigmas se forman los conidios que a modo de un collar de perlas se disponen uno a continuación del otro. Los conidios están coloreados (negro, marrón, ocre, verde, etc.) y confieren la coloración típica a la colonia.

Muchos representantes de los géneros *Penicillium* y *Aspergillus* causan perjuicios en materias primas, campos, pieles, frutos, etc. *Penicillium roqueforti* y *P. camemberti* (sustituido hoy en día por *P. caseicolum* de crecimiento más rápido) confieren respectivamente el gusto característico a los quesos de Roquefort y de Camembert. *P. notatum* y *P. chrysogenum* son los conocidos productores de la penicilina.

Pirenomicetos. Los pirenomicetos son hongos con peritecio. El peritecio presenta en su forma típica una pared propia verdadera. Las ascas surgen del suelo o de la parte inferior del cuerpo fructífero ampuliforme y se hallan rodeadas de paráfisis. El canal formado por la parte más estrecha está recubierto de perífisis (Fig. 5.7 y 5.8).

Entre los pirenomicetos se encuentra un gran número de hongos perjudiciales: los hongos "del mildiu verdadero", parásitos obligados (*Erysiphe*, *Uncinula necator*, *Sphaerotheca mors-uvae*, etc.), las especies saprofíticas de *Chaetomium*, 115 especies de *Neurospora* muy conocidas objeto de estudios genéticos. *Sordaria fimicola* y otros son coprófilos. Sobre los tocones de los árboles crecen las especies negras de *Xylaria* e *Hypoxylon*. *Nectria galligena* y *N. cinnabarina* producen enfermedades tumorales en los árboles. *Claviceps purpurea* es el llamado cornezuelo del centeno (*Secale cornutum*); otras especies de *Claviceps* atacan distintas gramíneas.

Ciclo de un pirenomiceto. Se tratará aquí el ciclo con el ejemplo del cornezuelo *Claviceps purpurea* (Fig. 5.13). Las ascósporas infectan los ova-

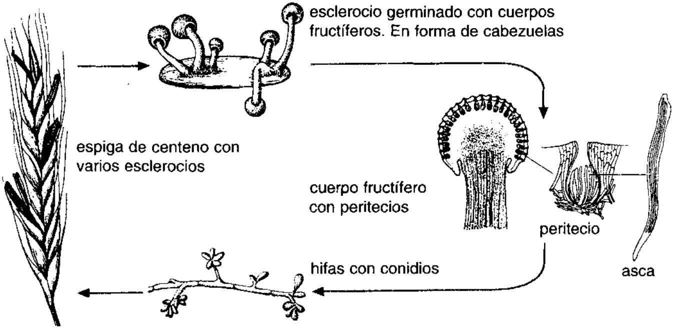

esclerocio germinado con cuerpos fructíferos. En forma de cabezuelas
espiga de centeno con varios esclerocios
cuerpo fructífero con peritecios
peritecio
asca
hifas con conidios

Fig. 5.13 Ciclo biológico del cornezuelo del centeno *Claviceps purpurea*.

rios del centeno en la época de floración. El micelio invade el ovario y lo transforma en primer lugar en una masa blanca y blanda. La superficie se arruga y en las arrugas surge un gran número de pequeños conidios hialinos dispuestos en el extremo de hifas muy apretadas que quedan suspendidos en un jugo azucarado (miel del centeno) y de este modo son diseminados por los insectos. Poco después se seca la superficie y el ovario invadido por los hongos se transforma en un esclerocio en forma de cuerno. Cuando los granos maduran los esclerocios caen al suelo e hivernan en el mismo. La germinación de los esclerocios tiene lugar en primavera después de haber sido estimulados por las heladas y una vez se presenta la humedad suficiente y las temperaturas adecuadas; de los esclerocios surgen cabezuelas largamente pediculadas en las que se forman numerosos peritecios dispuestos en las capas periféricas de las mismas. Cada asca presenta ocho ascósporas filamentosas.

El esclerocio presenta alcaloides de gran actividad (derivados del ácido lisérgico: ergobasina, ergotoxina, ergotamina) que han sido utilizados con fines farmacéuticos. Por esto se han obtenido esclerocios inoculando artificialmente el centeno, en el campo. El cornezuelo del centeno (*Claviceps purpurea*) puede cultivarse en medio líquido en profundidad.

Discomicetos. Los discomicetos presentan apotecios. Entre ellos se encuentran las setas más o menos conocidas y sobresalientes como las pezizas (*Peziza*), colmenillas (*Morchella*), helvelas (*Helvella*) y trufas (*Tuber*) pero también hongos perjudiciales como *Monilinia fructicola*, *Sclerotinia sclerotiorum*, *Rhytisma acerinum* y *Lophoderma*, por sólo nombrar unos pocos. Los apotecios son cuerpos fructíferos abiertos en forma de copa o de disco; en algunas setas son de un color rojo, amarillo o anaranjado vivo, otros son negros o marrones. Sobre los suelos quemados crece *Pyronema omphalodes* (*P. confluens*), el ejemplo característico utilizado para mostrar la formación de las ascas.

5.5 Basidiomicetos (hongos erectos)

Los basidiomicetos están considerados como los hongos más desarrollados. El órgano característico de los basidiomicetos es el **basidio**, una célula terminal comparable al asca. Por lo general, del basidio se forman por estrangulación cuatro **basidiósporas**. Tienen un solo núcleo y son haploides. Las basidiósporas son, al igual que las ascósporas, el resultado de la plasmogamia, cariogamia y meiosis; los dos últimos procesos se realizan en el basidio y en el asca respectivamente. El micelio de los basidiomicetos está formado por hifas septadas. Los filamentos blancos que pueden

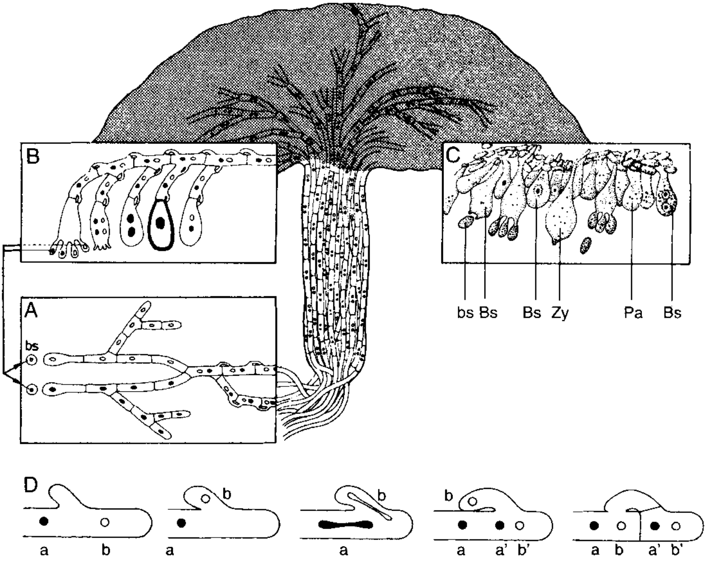


Fig. 5.14 Ciclo biológico de un basidiomiceto. Las zonas encuadradas constituyen una imagen muy aumentada de las hifas y basidios. **A** Formación de las hifas septadas a partir de las basidiósporas (bs) y plasmogamia y formación subsiguiente de la fíbula (abajo en **D** se presenta con mayor aumento; para aclaraciones consúltese el texto); **B** Formación de los basidios y estadios consecutivos de la formación de las basidiósporas; **C** Corte transversal del himenio con basidiósporas (bs), basidios (Bs), cistidios (Zy) y paráfisis (Pa).

verse en el follaje del bosque están formados por masas de hifas rodeadas por una corteza; se llaman rizomorfos.

Ciclo biológico de un himenomiceto. Tras la germinación de la basidióspora se forma el micelio primario constituido por hifas de células uninucleadas. El **micelio** secundario **dicariótico** se forma cuando se encuentran las hifas de dos cepas compatibles y cuando los protoplastos uninucleados se han fusionado entre sí (plasmogamia). Los dos núcleos se dividen de forma conjugada en cada división celular. En muchos basidiomicetos la división de la célula y del núcleo se efectúa mediante **la formación de una fíbula** (Fig 5.14). Este mecanismo garantiza que cada una de las nuevas células contenga un núcleo hijo. En las células a punto de dividirse se forma entre los dos núcleos a y b un gancho; este gancho se dirige hacia la parte posterior. El núcleo anterior b se desplaza al interior del gancho (fíbula) y los dos núcleos se dividen. En este momento se forma una pared celular que separa la parte anterior con los dos núcleos hijos a' y b'. Al mismo tiempo la fíbula se fusiona con la célula original y el núcleo b pasa a la misma a través de un poro. La célula situada en el extremo se separa de la fíbula mediante otra pared. En este momento cada una de las dos células presenta un núcleo a y un núcleo b.

En los casos típicos el micelio dicariótico se desarrolla y forma cuerpos fructíferos altamente organizados, los conocidos hongos de sombrerillo, bovistas, etc. Los basidios se forman en una capa determinada del cuerpo fructífero, el **himenio**. Está formado por un conjunto de basidios y de hifas estériles, las paráfisis y los cistidios. Los basidios se forman a partir de una célula terminal que aumenta de tamaño y en la que tiene lugar la cariogamia. El núcleo del zigoto sufre una meiosis y posteriormente da lugar a cuatro núcleos haploides. Entre tanto se han formado cuatro esterigmas con los primordios de las basidiósporas, a los que emigran los núcleos. Las basidiósporas son dispersadas activamente. Cuando se disponen en una capa densa puede verse que están pigmentadas. Esta coloración constituye una importante característica para su clasificación e identificación; se diferencian los hongos con esporas de diferentes colores: marrones, violetas, negras, ocres y otras.

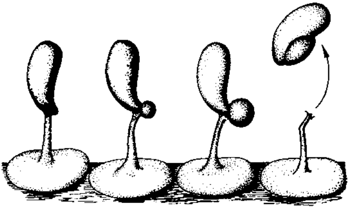


Fig. 5.15 El hongo *Sporobolomyces*. Suelta sus esporas mediante la segregación y la eliminación de una gota de agua.

El ciclo biológico descrito puede aplicarse también con algunas modificaciones a los homobasidiomicetos. Se caracterizan por la presencia de los basidios ya descritos. En cuanto a la posición del himenio pueden distinguirse los himenomicetos de los gasteromicetos. Al primer grupo pertenecen los hongos con sombrerillo (con láminas, agujas, poros, etc.), los hongos yesqueros y los hongos ramificados. En los gasteromicetos el cuerpo fructífero no se abre y el himenio no se encuentra en el exterior; las basidiósporas sólo se liberan al romperse el cuerpo fructífero (bovistas, estrellas, filos).

Los heterobasidiomicetos se dividen en tres órdenes: tremelales, uredinales y ustilaginales. La formación de los basidios se aparta de la de los homobasidiomicetos. En algunos grupos el probasidio se rodea de una membrana resistente y se comporta como una espora de resistencia. Desgraciadamente resulta imposible tratar aquí el interesante tema de las modificaciones de los basidios, y de la adaptación a las condiciones ambientales, del ciclo biológico de las plantas hospedadoras y de otros temas similares. No obstante, tiene que mencionarse una pequeña familia de hongos de aspecto parecido a las levaduras: las Esporobolomicetáceas. En el extremo de los esterigmas forman conidios sentados que son diseminados activamente, por lo que también se les llama balistósporas. *Sporobolomyces salmonicolor* se multiplica al igual que las levaduras por gemación. Cada célula puede formar un esterigma en cuyo extremo se forma una espora arriñonada. Al madurar se segrega una gota de agua en el extremo inferior cerca del punto de inserción y las esporas son lanzadas a una altura de cerca de 0,1 mm (Fig. 5.15). La mayoría de formas con basidios libres (himenomicetos) sueltan al parecer las basidiósporas según este mecanismo de secreción de una gota de agua.

5.6 Hongos imperfectos (deuteromicetos)

En esta clase se agrupan todos aquellos hongos que carecen del estadio sexual (perfecto) o en los que aún no ha podido probarse. El estadio conidial de estos hongos es muy parecido al tan bien conocido de los ascomicetos. Por eso puede suponerse que los hongos imperfectos representan el estadio conidial de ascomicetos en los que aún no se ha descubierto el estadio de asca o bien se ha perdido en el curso de la evolución.

Los hongos imperfectos no son sin embargo totalmente asexuales. En ellos ha podido probarse, como también se ha hecho en los basidiomicetos y en otros ascomicetos, la existencia de una **parasexualidad**. En estos hongos también existen los procesos de plasmogamia, cariogamia y meiosis, si bien no tienen lugar en puntos determinados del cuerpo fructífero ni en momentos determinados del desarrollo. El micelio primario es normalmente homocariótico, es decir, sólo presenta un tipo de núcleo. Se alcanza la **heterocariosis** por unión de protoplastos de tipos nucleares distintos. El núcleo que se ha introducido en el micelio se multiplica y los núcleos hijos se extienden por el micelio. El ciclo parasexual garantiza pues una recombinación efectiva del material nuclear semejante a la verdadera sexualidad.

La clasificación de los hongos imperfectos está basada en las formas secundarias de multiplicación y en otras características y sólo sirve para fines prácticos que permiten nombrarlos e identificarlos.

6. El crecimiento de los microorganismos

6.1 Nutrición de los microorganismos

El crecimiento de los microorganismos va ligado a la presencia de agua. Las sustancias disueltas en el agua, a partir de las cuales los microorganismos forman su material celular y obtienen energía, son los nutrientes. Los requerimientos de los distintos microorganismos en cuanto a la composición del medio de cultivo y a las demás condiciones ambientales son muy variables. Por ello se han descrito muchas recetas de la composición de los medios de cultivo para los microorganismos. Básicamente la disolución ha de cumplir la siguiente condición mínima: han de estar presentes todos los elementos implicados en la constitución del material celular, y en forma de compuestos utilizables.

Requerimientos nutricionales elementales. Desde el punto de vista de la composición química de las células se distingue entre 11 **macroelementos**: carbono, oxígeno, hidrógeno, nitrógeno, azufre, fósforo, potasio, sodio, calcio, magnesio, hierro (C, O, H, N, S, P, K, Na, Ca, Mg, Fe) contenidos en todos los microorganismos, y los **microelementos** u **oligoelementos**: manganeso, molibdeno, zinc, cobre, níquel, vanadio, boro, cloro, selenio, silicio, wolframio entre otros, que no los necesitan todos los organismos. Los metales pesados son principalmente componentes de los enzimas que transforman elementos o compuestos inorgánicos (O_2, N_2, H_2, S^0, SO_4^{2-}, SO_3^{2-}, NO_3^-, NO_2^-, NH_4^+). La mayoría de estos elementos que sólo se requieren en trazas, se encuentran como contaminación en las sales de los macroelementos y llegan a los medios de cultivo también a través de los frascos de vidrio y partículas de polvo. Por ello, la demostración del requerimiento de un determinado oligoelemento necesita precauciones especiales. Muchos iones metálicos son tóxicos en concentraciones milimolares (Hg, Cu, Zn, Ni, Co, Cd, Ag, Cr, Se).

La mayoría de los elementos se añaden a los medios de cultivo en forma de sal. En las tablas 6.1 y 6.2 se da la composición de un medio de cultivo sintético sencillo y de una disolución de oligoelementos.

Fuentes de carbono y energía. Los organismos que obtienen su energía a través de la fotosíntesis o de la oxidación de compuestos inorgánicos, son capaces de utilizar el anhídrido carbónico como fuente principal de carbono. Estos organismos autótrofos para el C reducen el CO_2. Todos los demás organismos obtienen el carbono celular principalmente a partir de nutrientes orgánicos. Estos últimos se utilizan generalmente tanto como

Tab. 6.1 Ejemplo de una solución nutritiva sintética sencilla.

K_2HPO_4	0,5 g
NH_4Cl	1,0 g
$MgSO_4 \cdot 7\ H_2O$	0,2 g
$FeSO_4 \cdot 7\ H_2O$	0,01 g
$CaCl_2 \cdot 2\ H_2O$	0,01 g
Glucosa	10,0 g
Agua	1000 ml
Solución concentrada de oligoelementos	1 ml

Tab. 6.2 Solución madre de oligoelementos.

$ZnCl_2$	70 mg
$MnCl_2 \cdot 4\ H_2O$	100 mg
$CoCl_2 \cdot 6\ H_2O$	200 mg
$NiCl_2 \cdot 6\ H_2O$	100 mg
$CuCl_2 \cdot 2\ H_2O$	20 mg
$NaMoO_4 \cdot 2\ H_2O$	50 mg
$Na_2SeO_3 \cdot 5\ H_2O$	26 mg
[$NaVO_3 \cdot H_2O$	10 mg]
[$Na_2WO_4 \cdot 2\ H_2O$	30 mg]
HCl (25%)	1 ml
Agua destilada	1000 ml

[ ], sólo lo requieren algunos organismos

Tab. 6.3 Solución vitamínica acreditada para bacterias del suelo y del agua.

Biotina	0,2 mg
Ácido nicotínico	2,0 mg
Tiamina	1,0 mg
4-Aminobenzoato	1,0 mg
Pantotenato	0,5 mg
Piridoxamina	5,0 mg
Cianocobalamina	2,0 mg
Agua destilada	100 ml

Se añaden 2-3 ml de la solución vitamínica a 1000 ml de la solución nutritiva.

fuente de carbono como de energía; en parte se asimilan en forma de sustancia celular, y en parte se oxidan para la obtención de energía. Las sustancias naturales más abundantes en cantidad sobre la Tierra son los polisacáridos celulosa y almidón. Muchos microorganismos son capaces de utilizar los componentes monoméricos de estos polímeros, la glucosa. No obstante, todas las demás sustancias orgánicas de origen natural también pueden ser utilizadas y degradadas por los microorganismos.

Suplementos. Muchos organismos requieren para su nutrición, además de minerales, fuentes de carbono y energía, algunos suplementos o factores de crecimiento. Se trata de algunas sustancias que pertenecen a los componentes básicos de la célula y que no pueden sintetizarse a partir de componentes más sencillos. Los factores de crecimiento pertenecen a tres grupos de sustancias, los aminoácidos, las purinas y pirimidinas, así como las vitaminas. Los aminoácidos, purinas y pirimidinas son componentes de las proteínas y los ácidos nucleicos, y la célula los requiere en las cantidades correspondientes; las vitaminas, por el contrario, son componentes de coenzimas o grupos prostéticos, y tienen por ello funciones enzimáticas o catalíticas, y se utilizan únicamente en cantidades muy pequeñas (Tab. 6.3). Los organismos que presentan requerimientos nutritivos se denominan también auxótrofos, en oposición a los prototrofos, organismos que no requieren estos suplementos.

Azufre y nitrógeno. Ambos elementos se encuentran en la célula predominantemente en forma reducida, como grupos sulfhidrilo o amino. La mayoría de los microorganismos son capaces de captar estos elementos en su forma oxidada y de reducirlos hasta sulfato y nitrato. La fuente de nitrógeno más común entre los microorganismos es la sal de amonio. Algunos procariotas son capaces de reducir el nitrógeno molecular (N_2 o dinitrógeno). Otros microorganismos necesitan aminoácidos, esto es, fuentes de nitrógeno que lo contengan ya en forma orgánica. Tampoco todos los microorganismos son capaces de reducir el sulfato; algunos requieren sulfuro de hidrógeno y otros cisteína como fuente de S.

Oxígeno. El oxígeno se encuentra a disposición de las células en forma de agua. Está contenido además en el anhídrido carbónico y en muchos compuestos orgánicos. Muchos microorganismos necesitan además oxígeno molecular (O_2 o dioxígeno). La función principal del O_2 es la de aceptor final de electrones en la respiración aeróbica; el O_2 se reduce entonces a agua. Las moléculas de oxígeno procedentes del O_2 únicamente se incorporan al material celular cuando la fuente de carbono es el metano o hidrocarburos de cadena larga o aromáticos.

Con respecto a la relación con el oxígeno se diferencian como mínimo tres grupos de organismos: los **organismos aeróbicos obligados** o **estrictos**, sólo pueden obtener energía mediante la respiración y necesitan O_2. Los **organismos anaeróbicos obligados** sólo pueden crecer en un medio sin O_2; el O_2 es tóxico para ellos (pág. 272). Los **microorganismos anaeróbicos facultativos** crecen tanto en presencia como en ausencia de O_2. Entre ellos hay que distinguir dos tipos: las bacterias del ácido láctico, aunque pueden crecer en presencia del oxígeno atmosférico, no pueden utilizarlo, sino que obtienen la energía exclusivamente por fermentación; son **aerotolerantes**. Otras bacterias anaeróbicas facultativas (Enterobacteriáceas) y muchas levaduras pueden obtener energía tanto por respiración (en presencia de O_2) como por fermentación (en ausencia de O_2).

Muchas, sino la mayoría, de las bacterias aeróbicas son **microaerófilas**, esto es, necesitan O_2 para la obtención de energía, pero no toleran la presión parcial del aire (0,20 bar), sino tan sólo entre 0,01 a 0,03 bar.

6.2 Medios de cultivo y condiciones de crecimiento

Una gran cantidad de microorganismos sin requerimientos, como por ejemplo muchos pseudomonas del suelo y del agua, pero también *Escherichia coli*, se desarrollan perfectamente en un caldo de cultivo con una composición como la indicada en la tabla 6.1. Muchos microorganismos necesitan además uno u otro de los oligoelementos, vitaminas o suplementos antes indicados. Si el medio de cultivo está compuesto por sustancias químicas definidas, se habla de un **medio de cultivo sintético** o **definido**. Se pretende conseguir definir para cada microorganismo los nutrientes mínimos para establecer un medio mínimo, que contenga únicamente los componentes necesarios para el crecimiento. Las especies más exigentes requieren un gran número de complementos. Para *Leuconostoc mesenteroides* se ha desarrollado un medio sintético que contiene más de 40 componentes.

Medios de cultivo complejos. Para muchos microorganismos exigentes no se conocen aún suficientemente bien los requerimientos nutritivos. Se cultivan en disoluciones que contienen extracto de levadura, autolisado de levadura, peptona o extracto de carne. Para algunos grupos de organismos son también corrientes: mosto (extracto de malta), infusión de heno, jugo de ciruelas, jugo de zanahoria, leche de coco, y para hongos coprófilos incluso extracto de excremento de caballo. Debido a los costos, a los medios de cultivo se les añade en lugar de sustancias puras otras complejas, como lactosuero, melazas, agua de maíz o extracto de soja, que son productos de desecho baratos. Los medios de cultivo de este tipo se denominan complejos o no definidos.

Medios de cultivo sólidos. Para obtener medios de cultivo sólidos se añade a los caldos de cultivo unas sustancias solidificantes, que dan a las disoluciones acuosas una consistencia gelatinosa. La gelatina ya sólo se utiliza en casos aislados, porque licua ya a 26-30°C y muchos microorganismos son capaces de licuar la gelatina. Un solidificante casi ideal es el descubierto en 1883 por HESSE, un colaborador de R. KOCH, al introducir el **agar** en la técnica bacteriológica. Es un polisacárido extraído de algas marinas, intensamente ramificado y entrelazado, de composición compleja. Se añade a las disoluciones acuosas en una concentración de 15-20 g/l. El agar funde a 100°C, pero se mantiene líquido al enfriarse hasta 15°C de temperatura. Es atacado tan sólo por pocas bacterias. Cuando se necesitan medios sin componentes orgánicos se utiliza el gel de sílice como solidificante.

Concentración de iones hidrógeno. Los iones H^+ y OH^- son los iones más móviles de todos; por ello, pequeñas modificaciones en su concentración tienen grandes consecuencias. El establecimiento de un pH inicial óptimo y el mantenimiento del pH durante el crecimiento es por ello de gran importancia.

La mayoría de los organismos se desarrolla óptimamente cuando los iones H^+ y OH^- están aproximadamente en igual concentración (pH 7,0). Muchas bacterias prefieren valores de pH superiores, un medio ligeramente alcalino, p. ej. los nitrificantes, los rizobios, los actinomicetos, las bacterias degradadoras de la urea (Fig. 6.1). Tan sólo pocas son ácidotolerantes (lactobacilos, *Acetobacter*, *Sarcina ventriculi*) o acidófilas (*Thiobacillus*). Los hongos prefieren valores de pH bajos; si se inocula con tierra medios complejos a distintos valores de pH, aparecerán preferentemente hongos a pH 5,0 y preferentemente bacterias a pH 8,0.

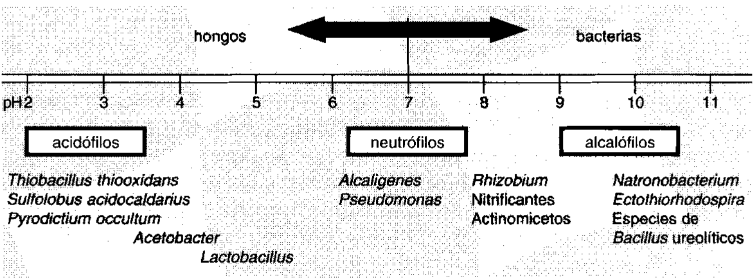

hongos
bacterias
pH2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
acidófilos
neutrófilos
alcalófilos
Thiobacillus thiooxidans
Sulfolobus acidocaldarius
Pyrodictium occultum
Acetobacter
Lactobacillus
Alcaligenes
Pseudomonas
Rhizobium
Nitrificantes
Actinomicetos
Natronobacterium
Ectothiorhodospira
Especies de
Bacillus ureolíticos

Fig. 6.1 Márgenes de pH tolerados o preferenciales para hongos y bacterias.

El mantenimiento de un determinado valor de pH durante el crecimiento tiene gran importancia sobre todo para aquellos microorganismos que a pesar de producir ácidos, no los toleran (lactobacilos, Enterobacteriáceas, muchos pseudomonas). La autodestrucción por los ácidos formados se combate utilizando sustratos no fermentables (para cultivos de larga duración) o tamponando el medio. Los fosfatos inorgánicos tienen ya un cierto efecto tampón, aunque leve a pH superior a 7,2. Si se da una excreción más fuerte de ácidos, se recomienda la adición de carbonato cálcico, y si no se quieren componentes insolubles, de carbonato sódico. En el último caso, hay que tener en cuenta que los iones bicarbonato están en equilibrio con el CO_2 disuelto físicamente, y por tanto con el contenido en anhídrido carbónico de la atmósfera gaseosa (p. ej. aire):

$$CO_2(\text{gas}) \rightleftharpoons CO_2(\text{disuelto}) \rightleftharpoons CO_2 + H_2O \rightleftharpoons H_2CO_3 \rightleftharpoons H^+ + HCO_3^-$$

La relación entre el pH, concentración de bicarbonato y presión parcial de CO_2 de la atmósfera gaseosa viene dada por la ecuación de HENDERSON-HASSELBACH; la concentración de ácido carbónico es igual al producto de la presión parcial de ácido carbónico y el coeficiente de solubilidad α:

$$\mathrm{pH} = \mathrm{p}K' + \log \frac{c\,(HCO_3^-)}{p\,(CO_2)\cdot\alpha}$$

Por lo demás, muchas bacterias son poco sensibles a pequeñas oscilaciones del pH entre 6 y 9. No obstante, las modificaciones rápidas determinan brevemente una leve alteración del valor del pH intracelular, aunque al cabo de 30 minutos se reinstaura el valor anterior de pH interno.

Las lesiones que aparecen a valores desfavorables de pH no se deben a los iones H^+ y OH^-; los últimos elevan únicamente el porcentaje de ácidos o bases débiles no disociados, que en estado no cargado penetran mucho más fácilmente en las células que sus productos de disociación. Los fisiológicamente activos son siempre los ácidos no disociados. El succinato, bibásico, o el ácido cítrico, tribásico, penetran tanto más rápidamente en la célula cuanto más bajo sea el valor de pH del medio.

Anhídrido carbónico. Un medio específico para el crecimiento de microorganismos autótrofos fijadores de CO_2 contiene generalmente bicarbonato sódico, y se incuba bajo una atmósfera que contenga anhídrido carbónico en un recipiente cerrado. También puede hacerse pasar aire o aire enriquecido en CO_2. Siempre hay que tener en cuenta la relación anteriormente indicada entre el pH, la concentración de bicarbonato y la presión parcial de CO_2 en la atmósfera.

Pero también los microorganismos heterotróficos, los que asimilan fuentes de carbono orgánicas, necesitan anhídrido carbónico. Muchas bacterias que viven de forma parásita en la sangre, los tejidos o el canal intestinal están adaptadas a atmósferas con un contenido elevado en anhídrido carbónico. Para ello se incuba a dichas bacterias con una mezcla de aire o gas que contenga en volumen un 10% de anhídrido carbónico. Hay que considerar además, que la eliminación del anhídrido carbónico, por ejemplo por absorción con hidróxido potásico, impide el crecimiento de casi todas las bacterias (véase fijación de CO_2, pág. 407).

Contenido hídrico y presión osmótica. Los microorganismos se diferencian ampliamente entre sí con respecto al contenido en agua. Para poder comparar las disoluciones acuosas y las sustancias sólidas desde el punto de vista del agua disponible, se recurre al parámetro **actividad del agua** (a_w) o humedad relativa. Este parámetro hace referencia a la fase de vapor de agua que se encuentra en equilibrio con un material sólido o una disolución. Indican el cociente entre la concentración de agua en la fase gaseosa en el espacio aéreo por encima del material, y la concentración de agua en el espacio aéreo por encima de agua pura a una temperatura determinada.

Los microorganismos pueden crecer a actividades hídricas entre 0,998 hasta 0,6. La menos exigente es la levadura *Saccharomyces rouxii*, que tolera altas presiones osmóticas; crece a a_w = 0,6. *Aspergillus glaucus* y otros mohos crecen a a_w = 0,8. La mayoría de las bacterias necesitan actividades hídricas de más de 0,98. La única excepción la constituyen las bacterias halófilas, con un $a_w = 0{,}75$.

Temperatura. Los microorganismos presentan distintos comportamientos en cuanto a las temperaturas de incubación que requieren. La mayoría de las bacterias del suelo o del agua son **mesófilas**; tienen su tasa máxima de crecimiento entre los 20°C y los 42°C. Los organismos **termotolerantes** son los que todavía pueden crecer a 50°C (*Methylococcus capsulatus*). Las bacterias **termófilas** crecen a temperaturas superiores a los 40°C con una tasa máxima y tienen el límite superior a los 70°C (*Bacillus stearothermophilus*, *Thermoactinomyces vulgaris*). Se denominan organismos **termófilos extremos** a aquellos que tienen su óptimo de crecimiento por encima de los 65°C (*Thermus aquaticus*, *Sulfolobus*); algunos de ellos pueden crecer a temperaturas por encima de los 70°C (varias especies del género *Bacillus* y *Clostridium*) o incluso por encima de los 80°C (*Sulfolobus acidocaldarius*) o incluso a 105°C (*Pyrodictium occultum*, una bacteria reductora de sulfato anaeróbica estricta). A las bacterias que crecen por encima de los 80 y 100°C se las denomina organismos **hipertermófilos**. Al otro extremo de la escala de temperaturas se encuentran los **psicrófilos** (o **criófilos**), organismos entre los que predominan algunas bacterias marinas (bacterias luminiscentes) y las bacterias del hierro (*Gallionella*); tienen su tasa óptima de crecimiento por debajo de los 20°C.

Aireación. El oxígeno es el aceptor de electrones imprescindible para todos los microorganismos aeróbicos estrictos. Para la mayoría de las bacterias que crecen sobre placas de agar o en medios líquidos poco profundos es suficiente el oxígeno del aire. No obstante, incluso en el interior y por debajo de una colonia bacteriana puede bajar hasta cero la presión parcial de oxígeno. La figura 6.3 explica esta situación y aclara el hecho

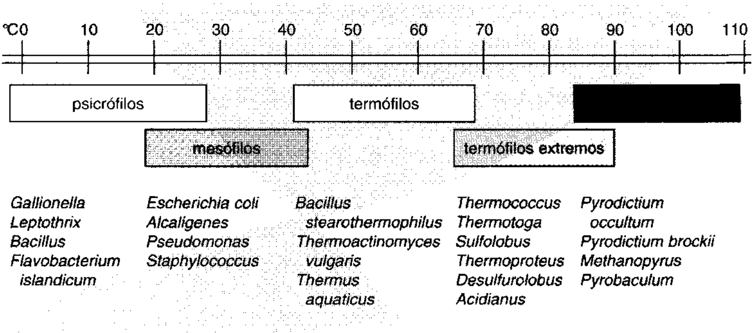

°C 0
10
20
30
40
50
60
70
80
90
100
110
psicrófilos
termófilos
mesófilos
termófilos extremos
Gallionella
Leptothrix
Bacillus
Flavobacterium islandicum
Escherichia coli
Alcaligenes
Pseudomonas
Staphylococcus
Bacillus stearothermophilus
Thermoactinomyces vulgaris
Thermus aquaticus
Thermococcus
Thermotoga
Sulfolobus
Thermoproteus
Desulfurolobus
Acidianus
Pyrodictium occultum
Pyrodictium brockii
Methanopyrus
Pyrobaculum

Fig. 6.2 Rango de temperaturas que permiten el crecimiento de diversas bacterias.

conocido desde antiguo de que, por ejemplo, la bacteria *Escherichia coli*, anaeróbica facultativa, cuando crece sobre un sustrato fermentable como la glucosa, incluso en presencia de aire pasa de respirar a fermentar, produce entonces ácidos orgánicos, y se suicida.

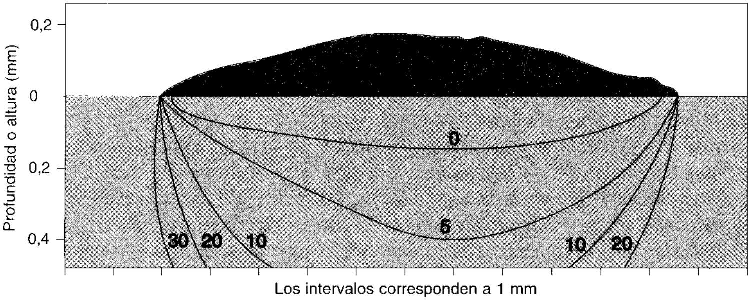


Fig. 6.3 Distribución del oxígeno en el interior de una colonia de *Escherichia coli*, y por debajo de ella, tras crecimiento sobre agar complejo. Las presiones parciales se midieron al cabo de tres días de incubación a 30°C mediante un microelectrodo de O_2. Los valores se dan en porcentajes de la presión parcial medida en el agar saturado de aire.

En los cultivos líquidos de mayor profundidad las bacterias aeróbicas sólo crecen en la superficie; por debajo las condiciones se van haciendo cada vez más anaeróbicas. Para permitir el crecimiento de microorganismos aeróbicos también en las capas profundas de un cultivo líquido es necesaria la aireación. Los microorganismos sólo pueden utilizar el oxígeno disuelto. Mientras que las sales minerales y los nutrientes orgánicos pueden estar en los medios de cultivo a concentraciones que permitan el crecimiento bacteriano durante horas o días, la solubilidad del oxígeno es baja. Un litro de agua que esté en equilibrio con el aire a la presión atmosférica a 20°C contiene tan sólo 6,2 ml o 0,28 mmol de oxígeno. Esta cantidad es únicamente suficiente para oxidar 0,046 mmol o 8,3 mg de glucosa (aproximadamente la milésima parte de la glucosa que se encuentra en un medio de cultivo normal). Por tanto, el oxígeno no puede almacenarse en el medio líquido, sino que hay que ir proporcionándolo continuamente. Afortunadamente los microorganismos están adaptados a una concentración muy baja de oxígeno disuelto; no obstante, no puede sobrepasarse una cantidad mínima, la concentración crítica de O_2 sin perjudicar la respiración celular.

La velocidad con la que se disuelve el oxígeno se incrementa estableciendo grandes superficies entre las fases gaseosas y líquidas, y elevando la presión parcial de oxígeno en la fase gaseosa. La aireación de cultivos líquidos se realiza generalmente con aire o mezclas de oxígeno, nitrógeno y anhídrido carbónico. Se intenta por distintos medios establecer una gran superficie de contacto entre las dos fases: 1. Cultivo en capas finas. 2. Movimiento del líquido por agitación (alternativa o circular). 3. Rotación de frascos planos a lo largo de su eje longitudinal. 4. Burbujeo de la columna líquida mediante aire a presión a través de difusores (placas porosas, frascos de KLUYVER). 5. Percolación (Fig. 6.4). 6. Agitación mecánica. En los cultivos sumergidos de microorganismos aeróbicos se utiliza frecuentemente la combinación de la aireación forzada con difusores (placas porosas, tuberas) y agitación mecánica. El "fermentador sin difusor" y el "sistema Waldhof" emplean la turbulencia ocasionada por una fuerte agitación. La figura 6.5 representa algunos frascos de cultivo en los que se procuró obtener a través de la forma una superficie máxima del líquido, y también algunos frascos para el cultivo sumergido. Hay que considerar que, incluso en un fermentador bien aireado o en las aguas naturales, la distribución del oxígeno no es siempre homogénea. Ya los mismos grumos de bacterias establecen microambientes en los que reina una presión parcial de O_2 reducida. Estos microambientes semianaeróbicos se forman en las aguas naturales por la materia en suspensión que contienen. Experimentalmente pueden simularse estas condiciones añadiendo

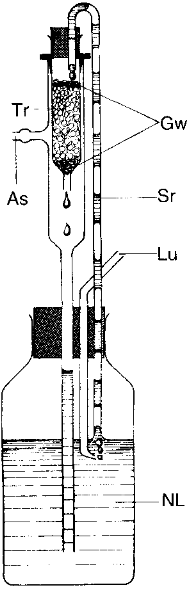


Fig. 6.4 Aparato de percolación para hacer fluir una solución nutritiva y aire a través de un material de soporte (suelo, bolas de vidrio, etc.). Si por el tubo aspirador (As) se extrae continua y lentamente aire, en la entrada de aire (Lu) éste penetra y conduce la solución nutritiva (NL) hacia la parte superior a través del tubo ascendente (Sr); la solución nutritiva y el aire fluyen a través del material de soporte (Tr); Gw = fibra de vidrio.

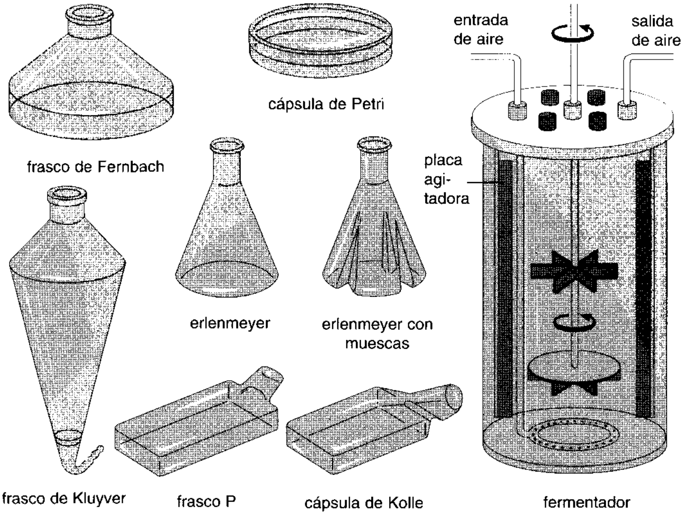

entrada de aire
salida de aire
cápsula de Petri
frasco de Fernbach
placa agitadora
erlenmeyer
erlenmeyer con muescas
frasco de Kluyver
frasco P
cápsula de Kolle
fermentador

Fig. 6.5 Recipientes para el cultivo superficial y sumergido de microorganismos aerobios.

partículas sólidas (arcilla, celulosa, quitina) a una suspensión bacteriana; en este caso las bacterias crecen como un “crecimiento masivo” denso alrededor de la superficie de las partículas y sufren igualmente una deficiencia de O_2. Para la demostración de este efecto resultan idóneas las bacterias anaeróbicas facultativas, que en condiciones de deficiencia de oxígeno pasan a fermentar (*Escherichia coli*) o a respirar nitratos (*Pseudomonas denitrificans*).

Cultivo anaeróbico. Para el cultivo de bacterias anaeróbicas estrictas es imprescindible la exclusión del oxígeno del aire. La **técnica anaeróbica** emplea medios de cultivo a los que se elimina el aire: hervidos, frascos cerrados sin que queden burbujas, atmósferas sin oxígeno en desecadores o frascos de WITT, sustancias para la absorción del oxígeno (pirogalol alcalino, ditionito, cloruro de cobre I), y otros medios auxiliares. La adición de sustancias reductoras (ácido ascórbico, tioglicolato, cisteína –si es posible– o también sulfuro) a los caldos de cultivo permite reducir o eliminar los efectos tóxicos del oxígeno del aire.

Las bacterias extremamente sensibles al oxígeno pueden subcultivarse también en el aire cuando se procura, mediante una corriente continua de nitrógeno libre de oxígeno en el frasco de cultivo, que el medio no entre en contacto con el aire (técnica de HUNGATE). Alternativamente, puede trabajarse en cabinas de siembra llenadas con nitrógeno, argón o hidrógeno libres de oxígeno. Como indicador coloreado de las condiciones anaeróbicas se añade resazurina al medio de cultivo (en presencia de oxígeno es azul, anaeróbicamente incoloro, después de reoxidación rojo) o bien se añade a los frascos de incubación anaeróbica un frasco con una disolución de glucosa y azul de metileno (anaeróbico: incoloro).

6.3 Tipos nutricionales

Los conceptos de "heterótrofo" y "autótrofo" pensados para denominar los tipos de nutrición de animales y plantas, no son suficientes para caracterizar la variedad de tipos nutricionales que se dan en los microorganismos. Para la descripción breve de los tipos nutricionales se han implantado nuevos términos, que hacen referencia a la **fuente de energía**, al **dador de hidrógeno** y a la **fuente de carbono.**

Fuentes de energía. Con respecto al mecanismo para la transformación de energía para obtener la forma energética bioquímicamente útil (ATP) se distinguen principalmente dos tipos metabólicos: los organismos fototrofos y los quimiotrofos. Los organismos que pueden utilizar como fuente energética para el crecimiento la radiación electromagnética (luz) se denominan **"fototrofos"** (fotosintéticos). Los organismos fototrofos abarcan a los pertenecientes a dos grandes grupos: las bacterias fototrofas anaeróbicas, que no desprenden oxígeno, y los fototrofos aeróbicos, cianobacterias, algas y plantas verdes, que producen oxígeno en la luz. **"Quimiotrofo"** (quimiosintético) indica la ganancia de energía por reacciones de oxidación-reducción en las que los nutrientes actúan como sustrato, independientemente de que la forma de energía bioquímica se obtenga por oxidación (respiración) o por fermentación.

Dadores de hidrógeno y fuentes de carbono. Todos los organismos que utilizan sustancias orgánicas como dadores de hidrógenos se denominan **"organotrofos"**. Se utiliza este término como antónimo de **"litotrofo"** que hace referencia a la capacidad de utilizar dadores inorgánicos de hidrógenos (H_2, NH_3, H_2S, S, CO, Fe^{2+} entre otros). Los términos "autótrofo" y "heterótrofo" han visto restringido su significado, puesto que hacen referencia exclusivamente al origen del carbono celular: los microorganismos son **"autótrofos"** cuando son capaces de obtener la mayoría del carbono celular por fijación del anhídrido carbónico, y **"heterótrofos"** cuando extraen el carbono celular de sustancias orgánicas.

Por lo general basta con indicar el proceso básico de obtención de energía y el dador de hidrógenos. Las plantas verdes, cianobacterias y las bacterias rojas del azufre son en este sentido fotolitotrofos; las bacterias nitrificantes quimiolitotrofas, y los animales y la gran masa de microorganismos quimiorganotrofos. En casos especiales puede incluirse el origen del carbono celular en la denominación.

6.4 Métodos de cultivo selectivo

El conocimiento de la diversidad de los microorganismos se debe a dos procedimientos. Algunos microorganismos han despertado nuestro interés por la formación de colonias, agrupaciones llamativas o por modificaciones en el medio. Muchos de estos microorganismos aparentes a simple vista pueden someterse a un **aislamiento directo**. Para estos organismos pudieron establecerse fácilmente los medios de cultivo y las condiciones de crecimiento que permitiesen su desarrollo. No obstante, muchos tipos fisiológicos distintos de microorganismos pudieron investigarse sólo cuando se desarrolló la técnica del cultivo de enriquecimiento de WINOGRADSKY y BEIJERINCK.

Cultivo de enriquecimiento. El método del cultivo de enriquecimiento es en su principio y en la práctica muy sencillo. Las condiciones de enriquecimiento son aquellas en las que un organismo se implanta por competencia. Estableciendo una serie de factores (fuentes de energía, carbono, nitrógeno, aceptor de hidrógenos, atmósfera, luz, temperatura, pH, etc.) se determinan unas condiciones ambientales precisas, y se siembra con una población mixta, como la que se presenta en el suelo o los lodos. En un caldo de enriquecimiento de este tipo se desarrolla mejor el más adaptado y sobrecrece a todos los demás organismos acompañantes. Mediante varias transferencias en el mismo caldo de cultivo y extensión en el mismo medio solidificado puede aislarse fácilmente la cepa enriquecida. Una "resiembra líquido-líquido" frecuente, después de cortos intervalos de tiempo, impide el crecimiento de los microorganismos acompañantes, que podrían aprovechar los productos de excreción, o incluso de autolisis, de las células favorecidas primariamente. Un material de inóculo apropiado lo ofrecen aquellas muestras de lugares en donde ya haya tenido lugar un "enriquecimiento natural": microorganismos utilizadores del monóxido de carbono en aguas residuales de fábricas de gas, utilizadores de hemoglobina en aguas residuales de mataderos y oxidadores de hidrocarburos en campos petrolíferos o depósitos de petróleo.

El cultivo de enriquecimiento permite aislar microorganismos con cualquier combinación de requerimientos nutritivos, naturalmente con la premisa de que el tipo elegido se presente en la naturaleza. Para los microorganismos muy especializados pueden establecerse condiciones de enriquecimiento especialmente selectivas. Un medio mineral sin nitrógeno combinado expuesto a la luz es muy selectivo para cianobacterias fijadoras de nitrógeno. Si al mismo medio de cultivo se le añade una fuente orgánica de energía y carbono predominará *Azotobacter* en la oscuridad y condiciones aeróbicas, *Clostridium* en condiciones anaeróbicas. El éxito de un cultivo de enriquecimiento radica en satisfacer tan sólo los requerimientos mínimos del tipo fisiológico que se intenta enriquecer. Si por ejemplo se buscan bacterias que oxiden metano o hidrógeno con nitrato o sulfato como aceptor de hidrógenos, hay que procurar eliminar el oxígeno; de otro modo predominarían las bacterias oxidadoras del metano o del hidrógeno aeróbicas. La selección puede emplear también la resistencia o la tolerancia frente a ácidos o bases, la influencia del calor o las radiaciones. Frecuentemente la selección incluye también una contraselección mediante el empleo de sustancias inhibitorias selectivas. Sobre un medio de cultivo con azida crecen por ejemplo en condiciones aeróbicas los lactobacilos, mientras que otros microorganismos de crecimiento aeróbico quedan reprimidos; azida, cianuro o sulfuro de hidrógeno seleccionan contra organismos aeróbicos, en cuyos procesos respiratorios están implicados los citocromos. En el diagnóstico médico para la demostración de *Corynebacterium diphtheriae* (sobre medios que contengan telurito) y de Enterobacteriáceas patógenas (agar-bismuto) se recurre a una inhibición selectiva. Acerca de la contraselección con penicilina para el enriquecimiento de mutantes auxotróficos de *Escherichia coli* insistiremos en la pág. 506. Para impedir el crecimiento de bacterias Gram positivas se añade penicilina a los medios de cultivo. El crecimiento de hongos, levaduras, protozoos y otros eucariotas se impide añadiendo cicloheximida.

En el material utilizado como inóculo por el experimentador puede haber varias cepas o variantes del mismo tipo fisiológico, que se diferencien tan sólo, por ejemplo, en los óptimos de pH o en las velocidades de crecimiento. Si se inocula con este material un cultivo de enriquecimiento, predominará la cepa **mejor adaptada** o la de crecimiento más rápido, y el resto de las cepas quedará sobrecrecida por ella y no podrán aislarse. Si el aislamiento se encamina a la obtención de un **gran número** de cepas que crezcan bajo estas condiciones selectivas hay que recurrir al **"método directo en placa"**. Si el inóculo se siembra sobre el medio selectivo solidificado, los tipos fisiológicos favorecidos se desarrollarán hasta formar colonias. Si las colonias están suficientemente separadas no compiten por los nutrientes; las cepas de crecimiento más lento no quedan reprimidas por las de crecimiento más rápido y pueden aislarse separadamente.

En la tabla 6.4 se dan las condiciones selectivas de crecimiento para una serie representativa de tipos fisiológicos. El cuadro reúne los datos al considerar el enriquecimiento de cada uno de los tipos fisiológicos.

Cultivo puro. Se entiende por cultivo puro a la descendencia (clon) de una sola célula. La función principal del microbiólogo es la obtención de

Tab. 6.4 Condiciones de enriquecimiento de algunas bacterias seleccionadas.

Microorganismos fototróficos (principal fuente de C: CO_2)

en luz	anaerobio	H_2 ácidos orgán.	fotoasimilados	λ >800 nm	Rodospiriláceas
		SH_2	dador de H		Cromatiáceas
		SH_2	dador de H	λ >715 nm	Clorobiáceas
	aerobio	$ClNH_4$ o KNO_3	como fuente N		Algas verdes
		N_2	como fuente N		Cianobacterias

Bacterias quimiolitotrofas (autótrofas) (principal fuente de C: CO_2)

		Dador de H	Aceptor de H	
sin compuestos orgánicos en oscuridad	anaerobio	NH_4^+	O_2	*Nitrosomonas*
		NO_2^-	O_2	*Nitrobacter*
		H_2	O_2	Bacterias del H_2
		SH_2, S, $S_2O_3^{2-}$	O_2	*Thiobacillus*
		Fe^{2+}	O_2	*Thiobacillus ferrooxidans*
	aerobio	S, $S_2O_3^{2-}$	NO_3^-	*Thiobacillus denitrificans*
		H_2	NO_3^-	*Paracoccus denitrificans*
		H_2	CO_2	Metanogénicas

Bacterias quimioorganotrofas (heterótrofas)

anaerobio aceptor externo de H	con	KNO_3 2% + ác. orgán.	Pseudomonas	desnitrificantes
		KNO_3 10% + extr. lev.*	esporulados	
		Sulfato + ác. orgán.	*Desulfovibrio*	
	sin	glutamato, histidina	*C. tetanomorphum*	
		lactato + extr. lev.	*Veillonella*	
		almidón + NH_4^+	*Clostridium*	
		almidón + N_2	*C. pasteurianum*	
		glucosa + NH_4^+	*Enterobacter* y organismos fermentadores	
		glucosa + 1% extr. lev.; pH 5	bacterias del ácido láctico	
		lactato + 1% extr. lev.	bacterias del ácido propiónico	
	aerobio	lactato + NH_4^+ benzoato + NH_4^+	*Pseudomonas fluorescens*	
		manitol, benzoato + N_2	*Azotobacter*	
		almidón + NH_4^+	*Bacillus polymyxa* y otros	
		4% etanol + 1% extr. lev.; pH 6,0	*Acetobacter, Gluconobacter*	
		5% urea + 1% extr. lev.	*Sporosarcina ureae*	
		petróleo + NH_4^+	*Mycobacterium, Nocardia*	
		celulosa + NH_4^+	*Sporocytophaga*	

* Inóculo pasteurizado extr. lev. = extracto de levadura

cultivo puro, demostrar su pureza sin lugar a dudas y mantener el cultivo puro libre de contaminación. El aislamiento del cultivo puro tiene lugar, con alguna excepción, sobre o en medios sólidos. Se inicia por la separación de una sola célula a partir de una población y requiere también que la colonia que surja de esta célula se mantenga separada de otras células o colonias. Las bacterias aeróbicas se aíslan según el método de vertido en placa de KOCH, o más sencillamente por siembra en estría con el asa de platino sobre medios con agar (Fig. 6.6). Las bacterias anaeróbicas se suspenden en agar calentado a una temperatura de 45°C y se incuban en ausencia de aire (Fig. 6.7). Con la separación cuidadosa de una colonia, posterior suspensión en un líquido y nueva siembra por estría o dilución en agar pueden conseguirse cultivos puros de la mayoría de microorganismos.

El aislamiento de un cultivo puro puede hacerse también en medios líquidos, siempre que el organismo predomine en el material de partida. Por una dilución en serie de la suspensión en el caldo de cultivo se consigue que en la última dilución se encuentre tan sólo una célula; el clon representa al cultivo puro.

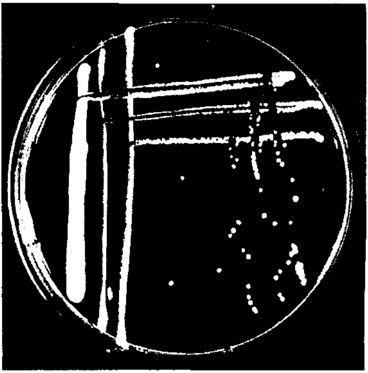


Fig. 6.6 Siembra por agotamiento para conseguir un cultivo puro de una bacteria aeróbica. Con ayuda de un asa de platino se sembró una suspensión bacteriana sobre la superficie del agar. Las estrías sucesivas iban perdiendo densidad celular. Las colonias aisladas situadas al final proceden muy probablemente de una sola bacteria. La colonia aislada situada en la parte superior de la imagen es un contaminante (Fotografía de B. LEHMANN).

Cultivo mixto. Las poblaciones naturales están compuestas por lo general de una mezcla de distintos microorganismos. Entre ellos se establecen interrelaciones de distinto tipo. Éstas se basan en la competencia por el sustrato común como comensalismo o mutualismo (véase pág. 593 y sig.). Para el estudio de las interrelaciones de este tipo, y otras, se hace cada vez más uso de los cultivos discontinuos. Tanto en los cultivos estáticos como continuos pueden establecerse condiciones definidas, y pueden determinarse sucesiones de distintos organismos y acumulaciones de productos metabólicos. A partir de aquí pueden extraerse conclusiones de relaciones sinergísticas o antagónicas entre los organismos. Los cultivos mixtos pue-

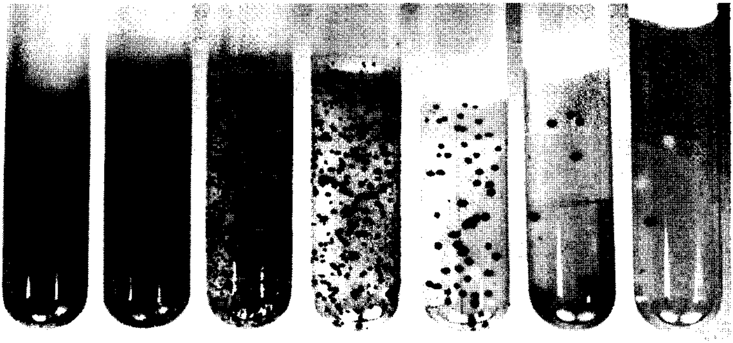


Fig. 6.7 Banco de dilución de una bacteria purpúrea del azufre en agar blando (0,8%) tras incubar durante siete días con luz. La imagen demuestra el aislamiento de un cultivo puro de bacterias anaeróbicas por el método de dilución. El agar se cubrió con una capa formada por parafina y parafinol a fin de evitar la entrada de oxígeno atmosférico (Fotografía de B. Lehmann).

den obtenerse también por unión de cultivos puros. Las investigaciones de cultivos mixtos definidos conducen al conocimiento de las relaciones complejas que se dan entre los microorganismos en el hábitat natural.

En la economía doméstica y en la industria no se utilizan exclusivamente cultivos puros, sino también cultivos mixtos, algunos de los cuales se denominan también "cultivos puros naturales". Ejemplos de ellos son la levadura, el kefir, el hongo de té, etc. También en la purificación de aguas residuales tienen un papel importante los cultivos mixtos, especialmente en la degradación de xenobióticos en las aguas residuales industriales.

6.5 Fisiología del crecimiento

Se entiende por crecimiento el incremento de materia viva, y por lo general, el incremento en el número de células y de la masa celular. La tasa de crecimiento es una medida de la modificación del número de células o de la masa celular en una unidad de tiempo. En los microorganismos unicelulares el crecimiento consiste en un incremento en el número de células. La célula bacteriana se multiplica por **división binaria**. Inicialmente la célula duplica su tamaño. A continuación se divide en dos células hijas, que tienen el mismo tamaño que la célula madre. El intervalo de tiempo para la duplicación del número de células se denomina **tiempo de generación**. El tiempo necesario para la duplicación de la masa celular se denomina tiempo de duplicación. Si consideramos que el número de células y la masa celular se duplican a lo largo de un mismo lapso de tiempo, el tiempo de generación (g) es igual al tiempo de duplicación (t_d). El valor recíproco, 1/g se denomina **tasa de crecimiento** (v); sus dimensiones son h^{-1}.

6.5.1 Métodos de determinación del número de células y de la masa bacteriana

Entre el incremento en el número de células y de la masa no tiene que haber una relación fija durante el crecimiento de una población bacteriana en un cultivo discontinuo o por cargas, como es por ejemplo una suspensión de bacterias en un matraz de Erlenmeyer. Tras la inoculación en el medio de cultivo algunas bacterias se dividen más rápidamente que el incremento en la masa; las células son inicialmente más pequeñas. En una fase posterior del crecimiento, la tasa de incremento de la masa puede sobrepasar a la del número de células. En la consideración de las fases del crecimiento, en las que el incremento del número de células y de la masa son en cierto modo iguales, no es necesario diferenciar entre ambas magnitudes. Se habla entonces de "células estándar" o de "crecimiento balanceado". En este caso, en lugar del número de células puede determinarse también la masa celular, o alguna dimensión proporcional, como la extinción (= absorción = densidad óptica). La masa celular referida a una unidad de volumen (litro o mililitro) se denomina también **densidad celular** o densidad bacteriana (g/l; g/ml).

Determinación del número de bacterias. En una población bacteriana no todas las células son viables. Se consideran células vivas a aquellas que son capaces de formar colonias sobre medios con agar, o de formar suspensiones en caldos líquidos. Las células viables se establecen mediante los métodos para determinar el número de células viables. En el número total de células se incluyen todas las células que pueden verse o demostrarse de otro modo, esto es, se incluyen también las células muertas y las lesionadas.

Número total de células. 1. El método más extendido para la determinación del número total de células se basa en el contaje al microscopio de las células extendidas en una capa delgada en una cámara de contaje (p. ej. según NEUBAUER, THOMA o PETROFF-HAUSER). Si el grosor de la capa es de 0,02 mm y el área cuadrangular tiene un lado de 0,05 mm (volumen 5×10^{-8} cm^3) el número de las células que allí se encuentran hay que multiplicarlo por 2×10^7 para obtener el número de células/ml. 2. El contaje relativo frente a cifras conocidas, p. ej. los eritrocitos de la sangre (aprox. 5×10^6 eritrocitos/ml) es uno de los métodos más antiguos. 3. Un contador electrónico, "COULTER-counter", supone una significativa simplificación; se basa en la pérdida de conductividad de la disolución de un electrólito cuando pasa una célula bacteriana a través de un orificio estrecho. 4. Para números de células inferiores a 10^6 células/ml puede utilizarse un método de filtros de membrana. El agua de mar, de un lago o de bebida se filtra a través de un filtro de membrana, este último se seca, se tiñe, se hace transparente y se cuenta al microscopio.

Número de células viables. Generalmente se cuentan las células viables que en condiciones favorables de crecimiento llegan a desarrollar colonias. Según el método de vertido en placas de KOCH se toma una parte alícuota de una suspensión celular homogénea diluida apropiadamente y se mezcla con agar nutritivo líquido (40-45°C), para verterlo en placas de Petri. La suspensión puede también extenderse sobre la superficie de agar de una placa de Petri con el asa de DRIGALSKY; las células también pueden depositarse por filtración sobre un filtro (Göttinger Membranfilter) que luego se sitúa sobre agar nutritivo o sobre discos de cartón impregnados de medio. En todos los casos se cuentan las colonias después de la incubación. La utilización del método de KOCH de vertido en placa y los métodos derivados, se limitan al contaje de células de la misma especie a partir de suspensiones homogéneas y no deben trasladarse al contaje de individuos de especies distintas en poblaciones mixtas.

Determinación de la masa bacteriana. La elección del método para la determinación de la masa bacteriana depende de para qué se tome como referencia a la masa bacteriana. Para la determinación de rendimientos se indica frecuentemente la masa húmeda o seca. Para actividades metabólicas o enzimáticas se utiliza el contenido proteico o en nitrógeno. Frecuentemente la elección de un método apropiado se efectúa bajo el punto de vista de la sencillez y la rápidez del método. Después del correspondiente calibrado acostumbran a preferirse en los procesos de rutina los métodos indirectos frente a los directos.

Métodos directos. 1. La masa húmeda se determina mediante centrifugación de las células. Después de la centrifugación de las células lavadas puede determinarse la masa seca. Ambos métodos están sometidos a errores sistemáticos considerables. 2. Significativamente más exactos son el contenido total de nitrógeno (método micro-KJELDAHL y microdifusión del amonio) y el contenido total en carbono (según VAN SLYKE-FOLCH). 3. De forma rutinaria se determina frecuentemente la proteína bacteriana. Modificaciones del método de Biuret y otras reacciones coloreadas determinables colorimétricamente dan buenos resultados. Los micrométodos se basan en la medida de componentes representativos de las proteínas (tirosina, triptófano; según LOWRY o FOLIN-CIOCALTEU).

Métodos indirectos. 1. Los métodos basados en la determinación de la turbidez son útiles para establecer la masa celular. En los trabajos rutinarios se mide la densidad de una suspensión por su extinción (turbidimetría). En algunas ocasiones la nefelometría es más precisa. La dependencia lineal entre los valores medidos y la masa bacteriana sólo se da en ambos métodos cuando se trabaja en la zona de muy baja densidad celular. Como la dispersión de la luz depende del diámetro, la forma y el índice de refracción de las partículas dispersantes, también de los componentes internos de la célula, las relaciones entre los valores ópticos y otras magnitudes más directas (masa seca, contenido en nitrógeno o en carbono) hay que establecerlas de nuevo para cada caso. 2. Magnitudes metabólicas que dependan directamente del crecimiento (captación de O_2, producción de CO_2 o ácido) pueden dar una medida adecuada de la masa de microorganismos. Su medida está indicada en aquellos casos en que fracasan los otros métodos, p. ej. cuando las densidades celulares son muy bajas. Para la medida pueden utilizarse métodos de titulación, manométricos y electroquímicos entre otros.

6.5.2 Crecimiento exponencial y tiempo de generación

Las bacterias se multiplican por división binaria; su multiplicación se corresponde, por lo tanto, con una progresión geométrica $2^0 \rightarrow 2^1 \rightarrow 2^2 \rightarrow 2^3 \ldots \rightarrow 2^n$. El número de células aumenta con un factor determinado cada unidad de tiempo. Se habla de **crecimiento exponencial**. Si la unidad de volumen de un cultivo discontinuo en crecimiento contiene N_0 células, el número de células N al cabo de n divisiones es $N_0 \cdot 2^n$. Pasando a los logarítmos se obtiene $\log N = \log N_0 + n \cdot \log 2$ y para el número de divisiones celulares

$$n = \frac{\log N - \log N_0}{\log 2}$$

Para el número de divisiones celulares por hora, también llamada tasa de división υ, se obtiene

$$\upsilon = \frac{n}{t} = \frac{\log N - \log N_0}{\log 2 \cdot (t - t_0)}$$

El tiempo necesario para un ciclo de división es el tiempo de generación

$$g = \frac{t}{n} = \frac{1}{\upsilon}$$

Si una suspensión de células se multiplica en 10 horas de 10^3 hasta 10^9 células, la tasa de división es

$$\upsilon = \frac{\log 10^9 - \log 10^3}{0{,}3010 \cdot 10} \approx \frac{6}{3} = 2$$

y el tiempo de generación es de media hora.

Si se representa el número de células de una población en crecimiento exponencial en ordenadas y el tiempo en abscisas, ambas magnitudes en escala aritmética, se obtiene una curva exponencial (Fig. 6.8). No obstante, esta representación aritmética no resulta apropiada para expresar un número grande de divisiones celulares, porque según qué escala se escoja, únicamente serán reconocibles las primeras divisiones o las últimas.

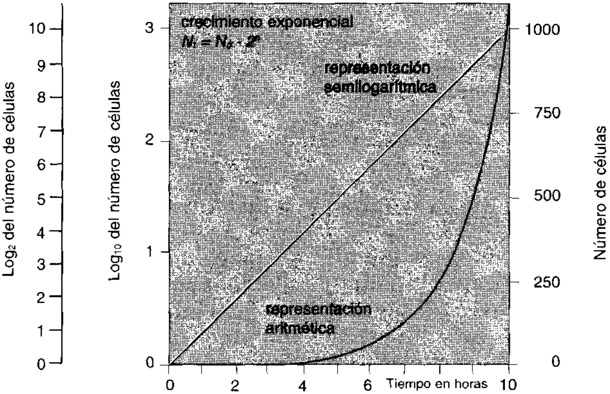


Fig. 6.8 Crecimiento exponencial de los organismos unicelulares. Representación aritmética (negro) y semilogarítmica (rojo) del número de células en función del tiempo.

Por ello se prefiere la representación semilogarítmica (Fig. 6.8), en la cual se coloca en ordenadas el logaritmo del número de células. En este tipo de representación el **crecimiento exponencial** se reconoce por una recta. La pendiente de esta recta corresponde a la tasa de duplicación; es tanto mayor cuanto más pendiente sea la recta. Como el crecimiento exponencial se caracteriza por una relación lineal entre el tiempo y el logaritmo del número de células, se habla también de **crecimiento logarítmico**.

En relación con la cinética del crecimiento se considera a la población bacteriana como un **sistema autocatalítico multiplicativo**. En los cálculos se toma como base la densidad bacteriana x o alguna magnitud proporcional a ella (número de células, absorción). La velocidad de modificación de la densidad bacteriana es entonces en cada momento proporcional y sigue una cinética de una **reacción de primer orden**. Durante el crecimiento exponencial es entonces la tasa de crecimiento

$$\frac{dx}{dt} = \mu x$$

en la que μ es la tasa de crecimiento. Por integración se obtiene

$x = x_0 \cdot e^{\mu \cdot t}$

y para una duplicación de la masa celular

$2\,x_0 = x_0 \cdot e^{\mu \cdot t_d}$. De aquí resulta

$2 = e^{\mu \cdot t_d}$ o bien

$\ln 2 = \mu \cdot t_d$ o bien

$$\mu = \frac{\ln 2}{t_d} = \frac{0{,}693}{t_d}$$

La tasa de crecimiento μ está relacionada por tanto con el recíproco del tiempo de duplicación, o tiempo de generación, la tasa de crecimiento υ

$$\upsilon = \frac{1}{t_d} = \frac{\mu}{0{,}693}$$

Los dos parámetros μ y υ hacen referencia al mismo proceso de crecimiento de una población bacteriana que se multiplica exponencialmente.

6.5.3 Crecimiento bacteriano en cultivo discontinuo

Si se inoculan bacterias en un medio de cultivo líquido, crecerán por lo general hasta que un factor llegue al mínimo y el crecimiento se vea limitado. Si durante este proceso no se adiciona ningún nutriente ni se elimina ningún producto metabólico se denomina a este crecimiento en este espacio predeterminado como cultivo discontinuo. El crecimiento en un "sistema cerrado" de este tipo está sometido a leyes que son válidas para los organismos uni- y pluricelulares. Un cultivo discontinuo se comporta como un organismo pluricelular con un crecimiento genético limitado.

El crecimiento de un cultivo bacteriano se ve claramente en la representación gráfica, cuando se expresan los logaritmos del número de células viables frente al tiempo. Una **curva de crecimiento** típica (Fig. 6.9) tiene un aspecto sigmoidal y permite diferenciar varias **fases de crecimiento** que se presen-

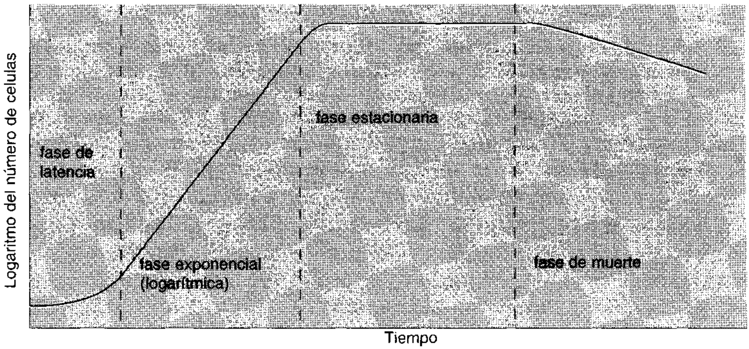


Fig. 6.9 Curva de crecimiento de un cultivo bacteriano.

tan regularmente de una forma más o menos acusada: fase de latencia (o lag), fase exponencial (logarítmica), fase estacionaria y fase de muerte.

El crecimiento sobre medios de cultivo sólidos es semejante, aunque las densidades celulares alcanzadas son muy superiores.

Fase de latencia. La fase de latencia abarca el lapso de tiempo entre la inoculación y el momento en que se alcanza la tasa de división máxima. La duración de la fase de latencia depende sobre todo del cultivo previo, de la edad del inóculo, así como de lo apropiado que sea el medio de cultivo. Si el inóculo procede de un cultivo previo viejo (fase estacionaria de crecimiento) la célula tiene que adaptarse primero a las nuevas condiciones de crecimiento mediante la síntesis de RNA, ribosomas y enzimas. Si las fuentes de energía y de carbono del nuevo caldo de cultivo se diferencian de las del cultivo previo, la adaptación a las nuevas condiciones va ligada frecuentemente a una nueva síntesis de enzimas que no eran necesarios en el cultivo previo y que no habrán sido sintetizados. La formación de los nuevos enzimas está inducida por el nuevo sustrato.

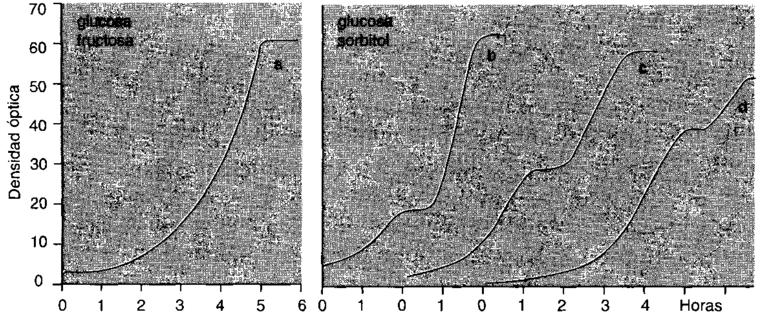


Fig. 6.10 Crecimiento bifásico (diauxia) de *Escherichia coli* en soluciones nutritivas con una relación determinada de glucosa y sorbitol. Con una mezcla de glucosa y fructosa se consigue una curva de crecimiento típica (a), pero con mezclas de glucosa y sorbitol en proporciones 1:3 (b), 1:1 (c) y 3:1 (d) se obtienen curvas de crecimiento bifásico (diauxia). (Según MONOD, J.: Recherches sur la croissance de cultures bactériennes, Hermann, París 1958.)

Un ejemplo demostrativo del efecto de los sustratos en la formación de enzimas lo ofrece el fenómeno de la llamada **diauxia** (Fig. 6.10). La aparición de este crecimiento bifásico o de un doble ciclo de crecimiento tiene lugar en soluciones nutritivas en las que se encuentran mezclas de nutrientes. Por ejemplo, de una mezcla de glucosa y sorbitol *Escherichia coli* utiliza primero la glucosa. La glucosa induce en primer lugar los enzimas necesarios para su utilización y reprime simultáneamente la síntesis de los enzimas necesarios para la utilización del sorbitol. Éstos no se producen hasta que se ha consumido la glucosa. Mediante estos procesos de regulación pueden explicarse suficientemente las dos fases de latencia.

Las modificaciones en la composición cuantitativa de las células bacterianas durante la fase de latencia se reflejan sobre todo en el contenido en ácido ribonucleico: el contenido en RNA aumenta de 8 a 12 veces. Este incremento en el RNA indica la participación del RNA y los ribosomas en la síntesis proteica y enzimática.

Fase exponencial. La fase de crecimiento exponencial (logarítmico; fase exp. o fase log) se caracteriza por un tiempo de generación constante y mínimo. El tiempo de generación durante la fase log es un parámetro específico de cada especie bacteriana y dependiente del medio. Las Enterobacteriáceas se dividen cada 15-30 min, *Escherichia coli* a 37°C aproximadamente cada 20 min. En otras bacterias el tiempo de generación es considerablemente superior, y para muchas bacterias del suelo es de 60-150 min, en *Nitrosomonas* y *Nitrobacter* incluso 5-10 horas.

En muchas bacterias el tamaño celular y el contenido en proteínas de la célula es constante durante la fase log; el cultivo está compuesto hasta cierto punto por "células estándar". Si este comportamiento está claramente demostrado y el número de células, proteína y masa seca aumenta con las mismas tasas, entonces puede seguirse el crecimiento midiendo una de estas magnitudes. Pero en muchos casos en un cultivo discontinuo las células se modifican durante el crecimiento exponencial, ya que el ambiente también se modifica continuamente, desciende la concentración de sustrato, aumenta la densidad celular y se acumulan productos metabólicos. Debido a la relativa constancia del tiempo de generación durante la fase log, ésta resulta idónea para la determinación de la tasa de crecimiento. Para el estudio de la influencia de factores ambientales (pH, potencial redox, temperatura, aireación o semejantes) así como la capacidad de utilizar diversos sustratos se sigue el incremento del número de células, o bien de la turbidez (extinción) durante el crecimiento exponencial.

Fase estacionaria. La fase estacionaria se instaura cuando las células ya no crecen. La tasa de crecimiento es dependiente de la concentración de sustrato; como consecuencia, al disminuir la concentración de sustrato ya aparece una disminución de la tasa de crecimiento antes de su total consumo. La transición de la fase exponencial a la estacionaria tiene lugar por tanto paulatinamente. Además de la disminución de sustrato, la densidad de población, la presión parcial de O_2 baja y la acumulación de productos metabólicos tóxicos pueden hacer disminuir la tasa de crecimiento e introducir la fase estacionaria. En la fase estacionaria pueden utilizarse aún materiales de reserva, descomponerse parte de los ribosomas y sintetizarse enzimas. Los procesos aislados dependen del factor que limite el crecimiento. Sólo las células muy sensibles mueren rápidamente. Siempre que pueda obtenerse energía necesaria por respiración de materiales de reserva o proteínas las bacterias permanecen largo tiempo vivas.

En muchos procesos microbianos de producción conducentes a la formación de un metabolito secundario (p. ej. penicilina) la fase estacionaria es la verdadera fase de producción. Por ello, en biotecnología se diferencia una **trofofase** (fase de nutrición o crecimiento) y una **idiofase** (fase de producción). A pesar de que las células no crezcan durante la idiofase, si se añaden sustratos, éstos aún son aprovechados y se incorporan precursores al producto.

La masa bacteriana alcanzada en la fase estacionaria se denomina **rendimiento** o **producción**. Depende del tipo y cantidad de los nutrientes añadidos y de las condiciones de cultivo.

Fase de muerte. La fase de muerte y las causas de la muerte de las células bacterianas en soluciones nutritivas normales se han estudiado aún poco. Relativamente claras son las condiciones cuando se acumulan ácidos (*Escherichia*, *Lactobacillus*). El número de células viables puede descender exponencialmente. En según qué circunstancias las células pueden lisarse por acción de los propios enzimas (autolisis).

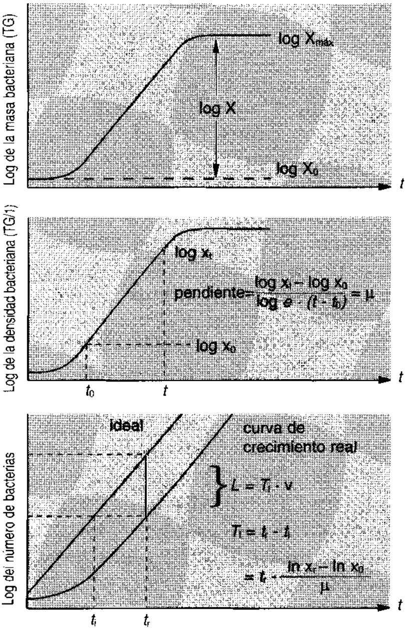


Fig. 6.11 Parámetros del crecimiento: rendimiento, tasa de crecimiento y período de latencia.

6.5.4 Parámetros de la curva de crecimiento

Si se sigue el crecimiento de un cultivo discontinuo a través de la multiplicación de la masa (masa seca) interesarán en primer lugar tres parámetros que caracterizan al crecimiento: la producción, la tasa de crecimiento y el período de latencia (Fig. 6.11).

Producción. La producción es la diferencia entre la masa bacteriana inicial y la máxima: $X = X_{máx} - X_0$. Se da en gramos de masa seca. De especial importancia es la relación de la producción con respecto al consumo de sustrato (X/S). Si las dos magnitudes se expresan en unidades de peso, al cociente se le denomina coeficiente de rendimiento o rendimiento del crecimiento (growth yield) Y. Frecuentemente se refiere la producción a la cantidad de sustrato y se calcula el coeficiente de rendimiento molar Y_m (g de células/mol de sustrato). Este coeficiente de rendimiento molar permite relacionar la producción con la cantidad de ATP que puede obtenerse a partir de la fuente energética (sustrato). Se llega así al coeficiente de rendimiento energético (g de células/mol ATP). Puede calcularse cuando se conoce la vía de degradación de un sustrato y la ganancia energética que así se consigue.

Para cultivos anaeróbicos de *Escherichia coli* y *Klebsiella pneumoniae* con tasas de crecimiento limitadas por la adición de glucosa, se midieron valores de Y_{ATP} de 12,4 y 14 g masa celular/mol equivalente de ATP. Para las bacterias anaeróbicas que obtienen la energía por fermentación el Y_{ATP} es un valor bastante constante. Si para una nueva bacteria se obtiene un valor significativamente superior, hay que considerar que existen "ingresos eventuales", esto es, la presencia de vías metabólicas energéticas accesorias. Los valores de Y_{ATP} se han calculado también para células en crecimiento aeróbico. Dependen de las condiciones de crecimiento y de las necesarias capacidades de síntesis; así por ejemplo, de si a las células se les proporciona como fuente de N iones amonio, iones nitrato o nitrógeno molecular.

Tasa de crecimiento exponencial. La tasa de crecimieto exponencial es una medida de la velocidad del crecimiento celular en la fase exponencial del crecimiento. Se calcula a partir de las densidades bacterianas x_0 y x_t en los tiempos t_0 y t, según

$$\mu = \frac{\log x_t - \log x_0}{\log e \cdot (t - t_0)} = \frac{\ln x_t - \ln x_0}{(t - t_0)}$$

donde log e = 0,43429. El tiempo de duplicación es $t_d = \dfrac{\ln 2}{\mu}$

Tiempo de latencia. El tiempo de latencia es un parámetro muy importante en la consideración de las características de una bacteria o de lo apropiado que pueda ser un medio de cultivo. El tiempo de latencia T_l es el intervalo de tiempo entre el tiempo t_r, en el que el cultivo ha alcanzado una determinada densidad x_r, y el tiempo t_i, en el que se hubiese alcanzado la misma densidad, caso de que hubiese crecido exponencialmente desde el momento de la inoculación (los índices son l para fase lag, r para crecimiento real e i para crecimiento ideal).

$$T_l = t_r - t_i = t_r - \frac{\ln x_r - \ln x_0}{\mu}$$

Como el parámetro T_l únicamente es útil cuando se comparan dos cultivos con tasas de crecimiento idénticas, se recomienda dar el tiempo de latencia en tiempo fisiológico (tiempo de generación *g*) y no en valores absolutos. La diferencia entre el tiempo observado real y el crecimiento ideal expresada en múltiplos del tiempo de generación es $L = T_l \cdot v$. Por tanto, el valor de *L* indica cuántas multiplicaciones de retraso lleva un cultivo real frente a otro ideal, que desde un principio hubiese crecido exponencialmente. Los valores de *L* son la forma de expresar normalmente los resultados de la influencia sobre el crecimiento de diversas sustancias nutritivas, inhibidores o condiciones del medio.

6.5.5 Crecimiento bacteriano en cultivo continuo

En un cultivo discontinuo se modifican continuamente las condiciones de cultivo; la densidad bacteriana aumenta y la concentración de sustrato disminuye. Sin embargo, para muchas investigaciones fisiológicas parece deseable mantener las células lapsos largos de tiempo con una misma concentración de sustrato y con unas condiciones ambientales también constantes, dejándolas crecer exponencialmente. Mediante una rápida y repetida transferencia de las células a un nuevo caldo de cultivo se pudo llegar a condiciones aproximadamente de este tipo. El objetivo se alcanza por una vía más sencilla si a una población bacteriana en crecimiento se le añade continuamente medio nuevo y se va eliminando suspensión bacteriana en la misma magnitud. La base de este procedimiento es el cultivo continuo, tal como se realiza en el quimiostato o en el turbidostato.

Crecimiento en el quimiostato. El quimiostato (Fig. 6.12) está compuesto por un recipiente de cultivo al que afluye un flujo constante de medio de cultivo de un recipiente de reserva. Por aireación y agitación mecánica se consigue en el recipiente de cultivo un suministro óptimo de oxígeno y una distribución homogénea lo más rápida posible de los nutrientes contenidos en el medio que va entrando. En la misma medida

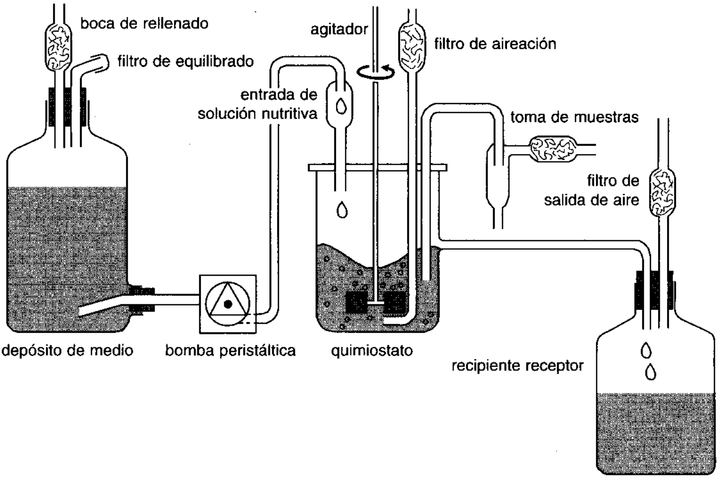

boca de rellenado
filtro de equilibrado
agitador
filtro de aireación
entrada de solución nutritiva
toma de muestras
filtro de salida de aire
depósito de medio
bomba peristáltica
quimiostato
recipiente receptor

Fig. 6.12 Principio del cultivo continuo en un quimiostato.

que entra medio de cultivo en el recipiente de cultivo, va saliendo suspensión bacteriana.

Si el volumen del recipiente de cultivo es V (litros) y el medio de cultivo fluye con un **flujo** f (l/h), la **tasa de dilución** es D = f/V. D indica por tanto, el cambio de volumen o renovación por hora. Si en el momento de poner en marcha el quimiostato las bacterias que se encuentran en el recipiente de cultivo (x [g/l]) no creciesen, se irían eliminando del recipiente según una **tasa de lavado**

$$D \cdot x = -\frac{d_x}{dt}$$

La densidad bacteriana en el cultivo iría disminuyendo exponencialmente según $x = x_0 \cdot e^{-Dt}$

El crecimiento de las bacterias en el recipiente de cultivo tiene lugar igualmente de forma exponencial. La **tasa de incremento** viene dada por la expresión $\mu x = dx/dt$, y la densidad bacteriana aumenta exponencialmente según $x = x_0 \cdot e^{\mu t}$.

La tasa de modificación de la densidad bacteriana dx/dt en el recipiente de cultivo viene dada por las dos velocidades citadas $dx/dt = \mu x - Dx$.

Si la tasa de crecimiento μ y la tasa de dilución D son iguales, la pérdida por lavado se iguala al crecimiento bacteriano, esto es, la modificación es

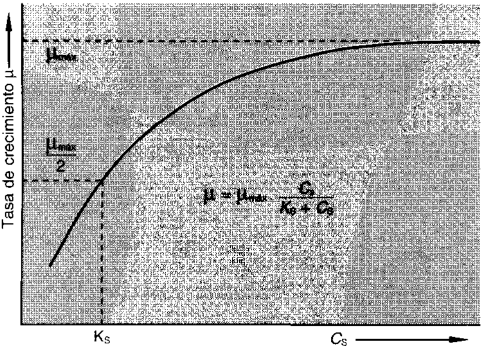


Fig. 6.13 Dependencia de la tasa de crecimiento μ con respecto a la concentración de sustrato c_s.

nula, y la densidad bacteriana x se mantiene constante. Bajo estas condiciones el cultivo se encuentra en un **"equilibrio dinámico"**; la multiplicación exponencial de las células está compensada por un proceso exponencial negativo.

El cultivo en el quimiostato está controlado por el sustrato. La estabilidad del sistema se basa en esta limitación de la tasa de crecimiento por la concentración de uno de los sustratos imprescindibles para el crecimiento (dador de H; fuente de N, S o P). Si a través de la limitación por sustrato se consigue que la tasa de crecimiento real μ sea menor que la tasa de crecimiento máxima alcanzable con el sustrato saturante, $\mu_{máx}$, entonces la tasa de dilución puede variarse en un amplio margen sin que las bacterias resulten lavadas. De todos modos, la tasa de dilución D no puede sobrepasar a $\mu_{máx}$.

La dependencia de la tasa de crecimiento μ con respecto a la concentración del sustrato c_s sigue una curva de saturación (Fig. 6.13). Por lo general las bacterias crecen ya a pequeñas concentraciones del sustrato (p. ej. 10 mg glucosa/l en el medio) con una tasa máxima. Tan sólo a concentraciones de sustrato inferiores μ es dependiente de la concentración. K_s es entonces la concentración para la cual la tasa de crecimiento tiene un valor semimáximo ($\mu = \mu_{máx}/2$). K_s es junto a $\mu_{máx}$ un parámetro fundamental del crecimiento de las bacterias en el quimiostato.

En la figura 6.14 se representa la densidad bacteriana, la concentración de sustrato, el tiempo de duplicación y la producción bacteriana frente a la tasa de dilución D. Si se varía la tasa de dilución D entre cero y el punto de lavado D_c, la densidad bacteriana se modifica muy poco dentro de un margen amplio. En esta zona las bacterias reaccionan frente a un incremento de D disminuyendo su tiempo de duplicación. La tasa de dilución

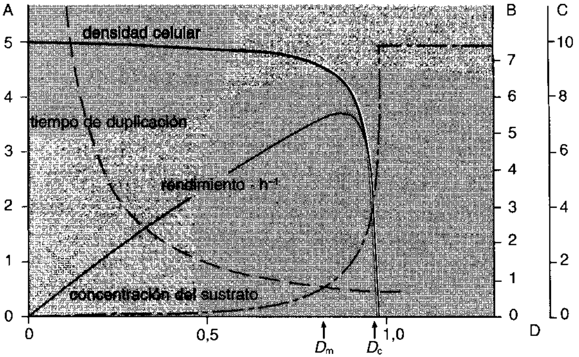


Fig. 6.14 Relaciones entre la densidad celular, la concentración del sustrato, el tiempo de duplicación y el rendimiento en equilibrio dinámico para distintas tasas de dilución D en un quimiostato. Estos valores han sido calculados para una bacteria de parámetros $\mu_{máx}$ = 1,0 horas, Y = 0,5 y K_s = 0,2 g/l y una concentración del sustrato en el medio de cultivo circulante de S_R = 10 g/l. Ordenadas: **A** rendimiento Dx (g/l/hora); **B** tiempo de duplicación t_d (horas); **C** concentración del sustrato en el recipiente estudiado c_s (g/l). Abscisas: tasa de dilución D (horas); D_m tasa de dilución para el rendimiento máximo; D_c salida de las células (según Herbert, D., R. Elsworth, R. C. Telling: J. gen. Microbiol. 14 [1956] 601).

creciente, y por tanto el flujo creciente y la tasa de crecimiento disminuida, se reflejan sin embargo en un incremento en las bacterias. El número alcanza un máximo en D_m, por encima de D_m desciende rápidamente.

La concentración de sustrato en el recipiente de cultivo, y por tanto en la suspensión que sale de él es prácticamente cero a tasas de dilución bajas en un amplio margen. Sólo cuando la tasa de dilución se acerca a la tasa de crecimiento máxima se lava conjuntamente parte del sustrato; por último, la concentración de sustrato alcanza en la salida a la del medio que entra.

La estabilidad del equilibrio dinámico en el quimiostato se basa en la limitación de la tasa de crecimiento por un sustrato. La tasa de crecimiento μ se mantiene a nivel bajo. El quimiostato puede manejarse fácilmente como un sistema autorregulado; si se establece a lo largo de bastante tiempo una velocidad de flujo constante, el sistema llega a regularse por sí solo.

Crecimiento en el turbidostato. Frente al cultivo continuo en el quimiostato se encuentra el del turbidostato. Tal como indica su nombre, el funcionamiento se basa en el mantenimiento de una determinada densidad bacteriana o turbidez. Un turbidímetro regula a través de una válvula el flujo de medio de cultivo. En el recipiente de cultivo están todos los nutrientes en exceso, y las bacterias crecen a una tasa próxima a la máxima. El funcionamiento del turbidostato es técnicamente más complejo que el del quimiostato.

Diferencias básicas. Entre el cultivo discontinuo clásico y el continuo en el quimiostato existen unas diferencias básicas, que debemos finalmente recalcar una vez más.

El **cultivo discontinuo** hay que verlo como un sistema cerrado (en cierto modo como un organismo pluricelular), que en su desarrollo cumple con una fase de latencia, una fase exponencial, una fase estacionaria y una fase de muerte (juventud, madurez, vejez y muerte). En cada momento reinan condiciones de cultivo distintas. Es casi imposible una automatización en un cultivo discontinuo.

El **cultivo continuo** representa un sistema abierto, que tiende hacia un "equilibrio dinámico". El factor tiempo está excluido hasta cierto punto. Para los organismos reinan siempre las mismas condiciones ambientales. El aparato puede automatizarse fácilmente.

6.5.6 Sincronización de la división celular

Para estudiar los sucesos metabólicos durante el ciclo de división de las bacterias se necesitan suspensiones de células que se dividan al mismo tiempo, que sean sincrónicas. Esta igualdad de fases en diversas células se alcanza mediante la sincronización. La sincronización se consigue mediante varios métodos, entre ellos por modificación de la temperatura, estímulos luminosos, limitación de nutrientes o por filtración de las células de igual tamaño. Una suspensión celular sincronizada por un tratamiento previo se vuelve asincrónica al cabo de pocas divisiones en la misma fase, y el número de células ya no aumenta escalonadamente, sino de una forma continua.

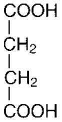
6.6 Inhibición del crecimiento y destrucción

Mediante una serie de sustancias químicas puede hacerse más lento el crecimiento de los microorganismos o impedirse totalmente. Si el crecimiento se detiene por acción de una sustancia y se reinicia una vez eliminada, se trata de un **bacteriostático** y de una **acción bacteriostática**. Los **agentes bactericidas** conducen a la destrucción de las células. Ambas acciones dependen de la concentración. Es notable que precisamente entre las bacterias existan tipos que pueden tolerar o incluso utilizar como fuente energética, venenos generales de las células y del metabolismo (sulfuro de hidrógeno, fenol, monóxido de carbono). Para un gran número de agentes antimicrobianos se conoce en cierta medida el punto de acción en la célula, así como el mecanismo de actuación.

Lesiones de las capas superficiales de la célula o estructura. A elevadas concentraciones (70%) el etanol provoca la coagulación de las proteínas y actúa como bactericida. Fenoles, cresoles, jabones neutros y agentes de acción superficial (detergentes) atacan a las capas celulares externas y lesionan la semipermeabilidad de la membrana citoplasmática. Las membranas están compuestas predominantemente por lípidos y proteínas ordenados en capas. Los detergentes tienen una constitución polar con grupos lipófilos (hidrocarburos largos o anillos aromáticos) y grupos hidrófilos ionizados. Se acumulan en las membranas lipoproteicas, igualmente de estructura polar, y las hacen no funcionales. Debido a su amplia acción bactericida los detergentes se utilizan en general como medios de desinfección para superficies y ropas. Algunos antibióticos polipeptídicos tienen una acción semejante a la de los detergentes (p. ej. polimixina, colistina, bacitracina, subtilina), lo mismo que algunas sustancias vegetales antimicrobianas.

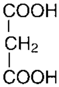
Lesiones de enzimas y metabolismo básico. Algunos metales pesados (p. ej. cobre, plata, mercurio, entre otros) actúan como venenos de enzimas ya a pequeñas concentraciones ("acción oligodinámica"). Tanto en forma de sales ($HgCl_2$, CuCl, NO_3Ag) como en forma de compuestos orgánicos (4-hidroximercuriobenzoato) fijan los grupos SH de los enzimas y modifican profundamente la estructura terciaria y cuaternaria de las proteínas. También se bloquea el grupo funcional mercapto del coenzima A. El cianuro es un veneno de la respiración y bloquea por unión del hierro la función del enzima terminal de la respiración, la *citocromo-oxidasa*. El monóxido de carbono inhibe la respiración por competencia con el oxígeno libre a nivel de la *citocromo-oxidasa*, actúa por tanto por "inhibición competitiva". La antimicina A inhibe el transporte de electrones en la cadena respiratoria bloqueando a la *citocromo-c-reductasa*. El 2,4-dinitrofenol desacopla la fosforilación de la cadena respiratoria en las mitocondrias. El arseniato inhibe la fosforilación a nivel de sustrato. El fluoracetato bloquea el ciclo de los ácidos tricarboxílicos, siendo activado primero igual que el acetato y siendo incorporado al citrato (síntesis letal), inhibiendo entonces, sin embargo, a la *aconitasa* en forma de fluorocitrato, y en consecuencia a las transformaciones posteriores del citrato.

Inhibición competitiva. Como ejemplo modelo de la inhibición competitiva citaremos aquí la inhibición de la transformación del succinato a fumarato a través del malonato. La acción es extraordinariamente específica y tiene lugar ya a bajas concentraciones de malonato. Mientras que la inhibición por cianuro (en determinadas concentraciones) no puede evitarse incrementando la concentración del sustrato, esto es, la presión parcial de oxígeno, la inhibición por malonato puede invertirse total o parcialmente incrementando la concentración de succinato. Piénsese que el metabolito normal succinato compite con el **análogo estructural** o **antimetabolito** malonato por el centro catalítico del enzima, la *succinato-deshidrogenasa*. Las inhibiciones competitivas se basan en la semejanza estructural del inhibidor y de la sustancia normal. La asimilación de un antimetabolito en la célula se puede manifestar sobre todo de distintos modos en la biosíntesis (véase también apartado 16.3). En el siguiente esquema se representan tres metabolitos (negro) y tres antimetabolitos (rojo).



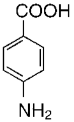
$HOOC-CH_2-CH_2-COOH$

succinato

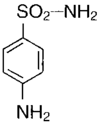


$HOOC-CH_2-COOH$

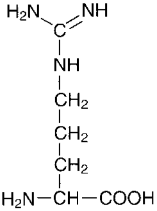
malonato



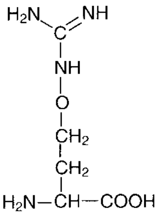
4-amino-benzoato



sulfanilamida



arginina



canavanina

Impedimento en la síntesis de componentes celulares. El ejemplo más conocido de una inhibición del crecimiento por la incorporación de un análogo estructural en un componente celular lo ofrece la acción de los derivados del ácido sulfanílico. La acción antibacteriana de las sulfonamidas se encontró de forma empírica (DOMAGK); posteriormente se reconoció en su semejanza estructural con el 4-amino-benzoato (véase antes) la clave para comprender el mecanismo de acción. El 4-amino-benzoato es un componente de un coenzima, el tetrahidrofolato. La mayoría de las bacterias lo sintetizan a partir de componentes sencillos. Pero el 4-amino-benzoato añadido al medio de cultivo, lo mismo que la sulfanilamida, se incorporan fácilmente a la célula y pasan a formar parte del folato; los últimos conducen, sin embargo, a la síntesis de un coenzima no funcional, y así en último término a la detención del crecimiento. La acción de la sulfonamida puede contrarrestarse por concentraciones crecientes de 4-amino-benzoato; la base de la inhibición es un **mecanismo competitivo**. Los organismos animales no son capaces de sintetizar folato *de novo* ni a partir de sus constituyentes y toman el coenzima completo con los alimentos. Por tanto, no puede incorporar sulfonamida en el coenzima y no resulta lesionado. La toxicidad selectiva de las sulfonamidas y la posibilidad de utilizarlas como quimioterapéuticos se debe a la elevada capacidad de síntesis de las bacterias y a la limitada capacidad de síntesis de los organismos animales.

La inhibición de la *succinato-deshidrogenasa* por el malonato y la inhibición del crecimiento por los derivados del ácido sulfanílico son ejemplos de relaciones antagónicas entre los metabolitos normales de la célula y las moléculas estructuralmente relacionadas. El **antagonismo** entre el metabolito y el antimetabolito (análogo estructural) puede manifestarse a distintos niveles. Los análogos estructurales pueden impedir la incorporación del metabolito normal y así evitar la síntesis de componentes celulares; pueden también incorporarse a polímeros y tener como consecuencia la disminución o pérdida de la actividad de un enzima o de un ácido nucleico.

Inhibición de la síntesis proteica por antibióticos. La síntesis proteica resulta inhibida en los procariotas específicamente por varios antibióticos. El punto de intervención es la función del ribosoma 70S. La estreptomicina y la neomicina impiden el proceso de unión de los aminoácidos. La eritromicina influye en la función de la subunidad 50S. Las tetraciclinas inhiben el anclaje del aminoacil-RNAt a los ribosomas. El cloranfenicol impide la incorporación de aminoácidos a proteínas, aparentemente inhibiendo el enlace de los aminoácidos mediante la *peptidil-transferasa.* El cloranfenicol se utiliza en la quimioterapia como un bacteriostático de elevada actividad, y en la investigación bioquímica como un inhibidor selectivo de la síntesis proteica sin influir sobre otras actividades metabólicas. Los antibióticos citados actúan naturalmente también sobre los ribosomas de las mitocondrias y los cloroplastos de los eucariotas. Pero ya que la membrana externa de las mitocondrias, por ejemplo, es muy poco permeable a la estreptomicina, ésta no tiene prácticamente ningún efecto sobre los eucariotas a las bajas concentraciones en las que se utiliza contra los procariotas. La división de los orgánulos se impide sólo cuando se utilizan concentraciones 1000 veces superiores. Si se deja actuar a la estreptomicina a elevadas concentraciones sobre eucariotas (levaduras, *Euglena,* puntos vegetativos de plantas superiores) se van lavando las mitocondrias y los cloroplastos a lo largo del crecimiento, y aparecen células y tejidos con un número significativamente reducido de orgánulos.

Inhibición de la síntesis de ácidos nucleicos por antibióticos. Igualmente, la síntesis de ácidos nucleicos se ve inhibida por varios antibióticos. La mitomicina C impide selectivamente la síntesis de DNA, sin influir en principio en la síntesis de RNA y de proteínas. La acción se debe a una unión y formación de puentes en el DNA de doble cadena y a roturas en las cadenas. La actinomicina D forma complejos con el DNA de doble cadena fijándose a la guanina; impide la síntesis de los tres tipos de ácidos ribonucleicos, pero no la replicación del DNA. La rifampicina actúa sobre la *RNA-polimerasa* DNA dependiente e impide así la síntesis de RNAm en bacterias.

Inhibición de la síntesis de la pared celular. La inhibición de la síntesis del glucopéptido en procariotas por la penicilina, cefalosporina y otros agentes que actúan a nivel de pared celular se consideró ya anteriormente (pág. 54 y sig.).

La muerte y destrucción de microorganismos. Por muerte celular se entiende entre los microorganismos a la pérdida irreversible de la capacidad de crecer y multiplicarse, o –refiriéndonos a la práctica experimental– a la pérdida de la "capacidad de formar colonias". Muchas lesiones celulares que conducen a la muerte celular son reparables y pueden superarse bajo determinadas condiciones. Son bien conocidas las reactivaciones después del efecto de las radiaciones UV o del calor (pág. 502 a 509). Pueden establecerse datos cuantitativos acerca de la muerte o destrucción en los microorganismos únicamente considerando las poblaciones, pero no para células aisladas. En algunos casos la tasa de disminución del número de células viables es en cada momento proporcional al número de células vivas presentes; la muerte sigue una cinética de una reacción de primer orden: $N = N_0 \cdot e^{-kt}$ (k = tasa de muerte exponencial). Éste es, por ejemplo, el caso de la esterilización por radiaciones.

6.6.1 Métodos de esterilización

La destrucción de microorganismos es la base de los métodos de trabajo microbiológicos y de la conservación de los alimentos; requiere por tanto una discusión. Se denomina **esterilización** a la liberación de un material de microorganismos vivos o en estado latente. Tenemos que distinguir tanto la **pasteurización** como la conservación. Si un medio estéril o en el que se cultiva otro germen presenta microorganismos que se han introducido de forma involuntaria se habla de **contaminación**. Los términos **desinfección** (eliminación de todos los microorganismos patógenos), **asepsia, antisepsia** e **infección** son más utilizados en higiene que en Microbiología.

Los microorganismos presentan un distinto grado de sensibilidad a los medios que se han establecido para eliminarlos. Hay diferencias de una especie a otra, dependencias del contenido en agua y del pH del medio, de la edad de las células o de las esporas, etc. Las tasas exponenciales de muerte y de destrucción dependen además de la especie de diversas condiciones ambientales. En lugar de esas tasas se expresa el éxito obtenido en la destrucción de una población determinada en condiciones determinadas con el valor *D*, esto es, el tiempo necesario para destruir el 90% de las células, llamado también "tiempo de reducción decimal" (D_{10}) (véase la tabla 6.5).

Tab. 6.5 Valores de D_{10} (tiempo de reducción decimal) de suspensiones de esporas en tres especies bacterianas formadoras de esporas.

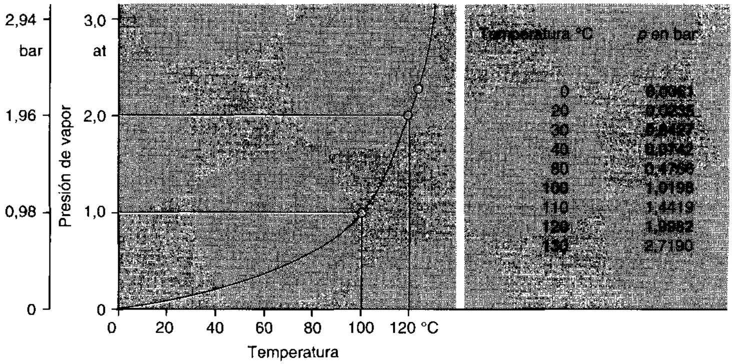
Esporas de	Tiempo de reducción decimal expresado en segundos a					
	105°C	120°C	130°C	140°C	150°C	160°C
Bacillus cereus	12,1	4,2	2,6	1,3	1,0	0,7
Bacillus subtilis	27,8	4,5	3,1	2,1	1,1	0,5
B. stearothermophilus	2857,0	38,6	8,8	3,9	2,4	1,4

Según Miller, I., O. Kandler: Milchwiss. 22 (1967) 686; modificado.

Puede **esterilizarse** o **pasteurizarse** por medio de calor húmedo, de calor seco, filtrando, irradiando o con medios químicos.

Calor húmedo. Las células vegetativas de las bacterias y hongos ya son destruidas a temperaturas de alrededor de 60°C (5-10 minutos), las esporas de las levaduras y de los hongos sólo por encima de 80°C y las esporas de las bacterias por encima de 120°C (15 minutos). El tiempo que se necesita que actúe el calor húmedo para destruir las esporas de algunas especies bacterianas representativas, extraordinariamente resistentes al calor, puede calcularse a partir de los tiempos de reducción decimal dados en la tabla 6.5. Obsérvese que cuanto mayor es el grado de contaminación, p. ej. el número de esporas termorresistentes, hay que calentar durante más tiempo.

Para alcanzar temperaturas superiores al punto de ebullición del agua se utiliza el **autoclave**. La temperatura del vapor liberado depende de la presión (Fig. 6.15). Si todavía hay aire, la temperatura que corresponde a una presión determinada es considerablemente inferior. Debido a que la des-



Temperatura °C	*p* en bar
0	0,0061
20	0,0233
30	0,0427
40	0,0742
80	0,4736
100	1,0133
110	1,4419
120	1,9882
130	2,7190

Fig. 6.15 Presión de vapor del agua a saturación.

Tab. 6.6 Tiempo de esterilización con autoclave de los líquidos contenidos en distintos recipientes (121-123°C).

Recipientes	Volumen	Tiempo de exposición en minutos
Tubo de ensayo	20 ml	12-14
Erlenmeyer	50 ml	12-14
Erlenmeyer	200 ml	12-15
Erlenmeyer	1000 ml	20-25
Erlenmeyer	2000 ml	30-35
Botella	9000 ml	50-55

trucción por medio de calor húmedo depende de la temperatura y no de la presión, tiene que procurarse eliminar el aire antes de cerrar el autoclave. El aire puede ser eliminado dejándolo fluir o bien haciendo el vacío. Por lo general tendría que medirse la temperatura y no la presión en el interior del autoclave; no obstante continúa midiéndose esta última debido a la facilidad que presenta y a motivos de seguridad. La duración de la esterilización depende naturalmente del tamaño (capacidad calorífica) del aparato que tenga que esterilizarse o del volumen; puede verse en la tabla 6.6.

A menudo se obtiene el mismo éxito de esterilización mediante **esterilización fraccionada** con vapor fluyente a 100°C (tindalización). Para ello se calientan las soluciones 30 minutos a 100°C tres días seguidos conservándolas entre tanto a temperatura de cultivo para que germinen las esporas y poder destruir las células vegetativas en el siguiente calentamiento.

Para muchos fines es suficiente una **esterilización parcial**, esto es, la destrucción de las formas vegetativas de los microorganismos. Esta esterilización parcial se efectúa por lo general por **pasteurización**, calentando a 75°C o a 80°C durante 5-10 minutos. La leche también se esteriliza de forma parcial pasteurizándola; se utilizan no obstante y a fin de no perjudicar el gusto de la leche, tiempos más cortos. Están en uso dos métodos de pasteurización: el calentamiento breve (20 segundos a 71,5-74°C) y el calentamiento a alta temperatura (2-5 segundos a 85-87°C). La leche se **esteriliza** también por calentamiento a temperaturas muy altas (UHT, "Ultra High Temperature"). Se inyecta en la leche vapor de agua supercalentado, con lo que la leche alcanza una temperatura de 135-150°C, que sólo se mantiene durante 1-2 segundos. Finalmente se deja que la leche se expanda en una tobera y se enfría simultáneamente, con lo que se elimina el agua que se había añadido al inyectar el vapor.

Los procesos de **conservación** de frutas pueden ser también considerados como una esterilización parcial ("poner en conserva"). Cuando los frascos de las conservas se calientan como es habitual a 80°C durante 20 minutos sólo se destruyen las células vegetativas y muchas esporas de hongos, mientras que las esporas de las bacterias continúan siendo viables. El valor tan bajo del pH debido a los ácidos de los frutos impide la germinación de las esporas de las bacterias. Afortunadamente no existe ninguna espora termorresistente bacteriana capaz de desarrollarse a pH inferior a 4,5. Frutos poco ácidos (judías, guisantes, zanahorias, setas, entre otros) pueden conservarse también por pasteurización si se añaden 1 o 2 cucharadas de vinagre para alcanzar la acidificación necesaria. Una excepción: sobre fresas pasteurizadas aparece frecuentemente el "hongo de las fresas" *Byssochlamys nivea*. Sus ascósporas resisten bien los 86°C; a esta temperatura el D_{10} es de 14 min.

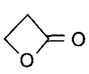
Calor seco. Si se someten a calor seco las esporas de las bacterias sólo son destruidas a temperaturas más altas y con tiempos de acción más prolongados que si se las somete a calor húmedo. Por eso el material de vidrio, los polvos y aceites insensibles al calor son esterilizados manteniéndolos dos horas en un horno con calor seco a 160°C. En el caso de materiales de alta capacidad calorífica o con propiedades de aislamiento térmico tiene que considerarse el tiempo de calentamiento. No obstante, en todos los casos se recomienda un control de temperatura (por medio de indicadores) o un control de esterilidad. Si el material lo permite, actualmente se calientan 30 minutos a 180°C. La experiencia demuestra que así se eliminan todas las esporas. La destrucción por el calor se debe a la coagulación de las proteínas celulares.

Filtración. Las soluciones con sustancias termolábiles (vitaminas, algunos aminoácidos, azúcares, otros sustratos) se esterilizan por filtración, debido a la comodidad que presenta este mecanismo. Ya en el laboratorio de PASTEUR se utilizaban cilindros de porcelana no vidriados (filtros de CHAMBERLAND). En el laboratorio, y para la esterilización del agua de bebida se utilizan filtros de tierra de diatomeas prensadas. No menos adecuados son los filtros de fibra de vidrio o de membrana. Los filtros de membrana de nitrocelulosa (Sartorius o Millipore) se presentan con distintos diámetros de poro; los filtros desechables pueden adaptarse a jeringuillas y se utilizan actualmente de forma rutinaria para la esterilización de disoluciones que no soportan la esterilización por calor. Con ayuda de filtros de membrana pueden incluso separarse organismos de distinta forma o tamaño. Las partículas víricas no son retenidas por los filtros. Debemos indicar también, que al hervir o en el autoclave incluso azúcares como glucosa y fructosa pueden interconvertirse o desdoblarse. Cuando la glucosa es más estable es a pH entre 3 y 5 al estar disuelta en agua y puede esterilizarse en el autoclave. Pero si la glucosa se hierve a pH 8 durante 30 min, el 40% (peso/peso) se transforma en fructosa. Las sales metálicas (Fe, Mn, Mo, etc.) aceleran la transformación. Como la fructosa se transforma en ácidos húmicos en estas condiciones, los caldos de cultivo esterilizados de este modo adquieren frecuentemente una coloración parda o negra.

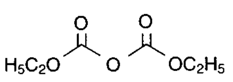
Irradiación. De las radiaciones utilizadas para efectuar esterilizaciones totales o parciales (radiación ultravioleta, rayos X, rayos gamma) es la radiación UV la que tiene mayor interés para su uso en el laboratorio. La radiación de la mayoría de lámparas UV es rica en radiaciones de longitud de onda próxima a 260 nm, radiación absorbida preferentemente por los ácidos nucleicos y que si actúa durante un tiempo prolongado provoca la destrucción de todas las bacterias. La radiación UV es adecuada para esterilizar parcialmente habitaciones ya que destruye con gran rapidez a las bacterias aunque con una lentitud muy superior a las esporas de hongos cuya sensibilidad a la radiación es notablemente inferior (apartado 15.1.4; Fig. 15.3). Las radiaciones ionizantes son utilizadas para esterilizar los alimentos y otros materiales compactos.

Radiaciones ionizantes. Los rayos X, las radiaciones de alta energía y las gamma, p. ej. del ^{60}Co, deben su actuación a la formación de radicales hidroxilo (OH·) que lesionan a macromoléculas. Para matar las células son suficientes dosis de radiación (dosis de energía) extremadamente bajas. Ello es comprensible, porque de la macromolécula de DNA sólo existe una copia en la célula, mientras que de proteínas y polisacáridos hay muchos representantes. Una "diana" en el DNA conduce a la muerte celular sin que se puedan demostrar modificaciones en otras moléculas. Las radiaciones ionizantes pueden utilizarse por ello para esterilizar alimentos y otros materiales compactos.

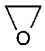
Medios químicos. Para la esterilización de alimentos, de fármacos y de aparatos así como en la práctica de laboratorio se ha acreditado el *óxido de etileno* (*oxirano*). Destruye tanto las células vegetativas como las esporas, si bien sólo actúa en presencia de agua (con un contenido de agua del 5-15%). Se utiliza en forma gaseosa mezclado con nitrógeno o con anhídrido carbónico (2-50% de óxido de etileno).



ß-propiolactona



dietil pirocarbonato



óxido etilénico

A fin de proteger las sustancias termolábiles de las soluciones nutritivas se ha introducido la esterilización con ß-propiolactona (propano-3-ólido). Es mucho más activa que el óxido de etileno, si bien puede presentar una acción carcinogénica secundaria considerable así como otras acciones fisiológicas. Se añade en un 0,2% al medio ya preparado que se incuba a continuación a 37°C durante 2 horas. Si se deja toda la noche el medio con propiolactona ésta queda totalmente destruida. Los hidratos de carbono no son atacados. Las bebidas también pueden esterilizarse con dietildicarbonato (0,003-0,02%).

Para **esterilizar** externamente **las semillas** que se han de utilizar para obtener plantas estériles resultan adecuados agentes microbicidas como el ácido bromhídrico (1%), el sublimado alcohólico ($HgCl_2$ 1%), $AgNO_3$ (0,05%), el hipoclorito cálcico (1% Cl_2) y otros, dejándolos actuar de 5 a 30 minutos. Antes de utilizar estos medios ha de humedecerse completamente la superficie de las semillas lo que se consigue por tratamiento con jabones y otros agentes emulsionantes.

Para la limpieza y **desinfección de recipientes de vidrio** basta normalmente el lavado con agua caliente y detergentes, entre ellos el SDS (dodecilsulfato sódico) o cualquier detergente casero.

6.6.2 Procesos de conservación

Los productos orgánicos están sometidos a la degradación por microorganismos si no se evita la multiplicación y acción de los microorganismos con determinados medios y condiciones. Para mantener o conservar los productos orgánicos son adecuadas distintas medidas. Los procesos de conservación que sirven para proteger los alimentos tienen una importancia máxima. De los problemas relacionados con esto se ocupa la **Microbiología de los alimentos.**

Los alimentos no sólo se estropean, no pudiendo ser utilizados por el hombre, al ser destruidos o degradados por los microorganismos (putrefacción aeróbica o anaeróbica), sino también cuando son atacados por bacterias y hongos que produzcan toxinas. Los productores más importantes de toxinas en los alimentos son *Clostridium botulinum* y algunas especies de *Staphylococcus.* El primero produce una exotoxina altamente tóxica incluso en cantidades insignificantes, que actúa sobre el sistema nervioso, una neurotoxina. Los estafilococos producen una enterotoxina, responsable de la "intoxicación por alimentos" y que actúa sobre todo en el intestino. Algunos hongos producen micotoxinas, de las que la más conocida es la aflatoxina (producida por *Aspergillus flavus*).

Los **procesos de conservación** que evitan la descomposición microbiana de los alimentos utilizan distintos métodos. Pueden utilizarse procesos químicos o físicos.

Procesos físicos. Anteriormente ya se ha hablado de la **esterilización** por el calor. Las "latas de conserva", por ejemplo, se someten a autoclave en la mayoría de casos. Los zumos de frutas ácidos también pueden conservarse aunque sólo se les haya sometido a pasteurización y sólo se hayan destruido las células vegetativas pudiendo aún germinar las esporas; las endósporas bacterianas no pueden germinar en medio ácido.

Se utiliza una **esterilización por filtración** con filtros de capas y de celulosa de poro fino para esterilizar los zumos de frutas, el agua mineral y los productos terapéuticos. La fermentación del vino se interrumpe en el momento deseado por centrifugación y filtración de modo que se conserve un "resto de dulzor".

El antiguo y extendido proceso de **desecar** los alimentos se basa en el hecho de que los microorganismos necesitan para su crecimiento un contenio en agua determinado (por lo general más de un 10% de agua). Los copos de avena, la fruta pasa, el heno seco y los granos de los silos deben su conservabilidad al estado seco en que se encuentran y en seguida se echan a perder por la acción de hongos y de bacterias cuando toman agua del aire húmedo.

La posibilidad de **irradiar** los alimentos se halla muy limitada. La radiación ultravioleta se utiliza sobre todo para esterilizar habitaciones en lecherías, depósitos frigoríficos, panaderías y en otras industrias. La conservación de los alimentos por medio de **radiaciones ionizantes** resulta teóricamente posible por la alta penetración de esa radiación, pero aún no se utiliza de forma general. Resulta comprensible que las bajas dosis necesarias para matar a los microorganimos no provoquen ningún cambio perceptible en el material a esterilizar. Un proceso seguro y también cada vez más utilizado en la economía doméstica consiste en **almacenar** los alimentos a **bajas temperaturas**. Los congeladores y depósitos frigoríficos conservan los productos congelados a temperaturas inferiores a –20°C. El mantenimiento de los alimentos a esas temperaturas provoca una disminución notable de la viabilidad de los microorganismos o bien la destrucción de las toxinas; no obstante el crecimiento queda totalmente impedido. Incluso las bacterias psicrófilas son incapaces de vivir a temperaturas inferiores a los –12°C.

Procesos químicos. La conservación por **acidificación** se basa en el hecho de que tan sólo unos pocos microorganismos son capaces de crecer a pH bajo en ausencia de aire. Para destruirlos basta una pasteurización; las esporas termorresistentes no germinan a pH inferior a 4,0. Se utiliza la conservación por acidificación natural en relación con la fermentación láctica para preparar la col ácida ("sauerkraut"), los pepinillos ácidos, los embutidos, etc. En muchos casos se añade ácido acético, ácido láctico, ácido tartárico o ácido cítrico. Los alimentos acidificados pero no pasteurizados pueden ser destruidos por las levaduras y hongos cuando entra aire.

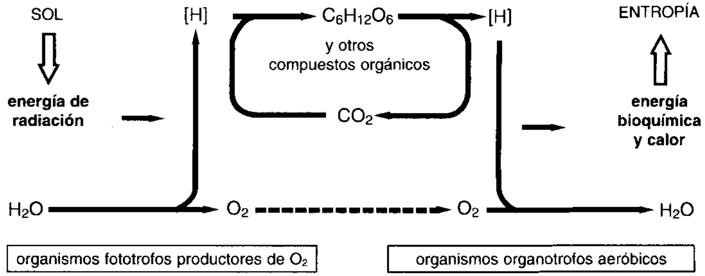
La carne y los pescados pueden conservarse **por ahumado**. Este proceso consiste en disminuir el contenido de agua y en introducir en el producto ahumado sustancias de acción antimicrobiana: fenoles, cresoles, aldehídos, ácido acético, ácido fórmico. En la **salazón** se introducen los alimentos en soluciones de sal común; este tratamiento provoca una pérdida de agua e inhibe el crecimiento de los microorganismos putrefactores; sólo unas pocas bacterias halófilas llegan a multiplicarse.

Las concentraciones altas de **azúcar** (alrededor de un 50% de sacarosa) inhiben el crecimiento. La conservación de las mermeladas y de los jarabes se basa en primer término en el contenido en ácidos y en azúcares.

Para la conservación de una serie de alimentos ha sido necesaria la adición de **productos químicos conservantes**. Hasta hace poco el vino se conservaba gracias a la adición de ácido sulfuroso; hoy en día el vino y los zumos de frutas se conservan añadiendo, si es imprescindible, dietildicarbonato.

También se añaden para la **conservación de los alimentos** ácido sórbico, ácido benzoico o ácido fórmico. Los cítricos se tratan superficialmente con difenil y con o-fenilfenolato. Finalmente también se intenta limitar el crecimiento de microbios aplicando antibióticos.

7. Mecanismos básicos del metabolismo y de la obtención de energía


SOL
energía de radiación
[H]
$C_6H_{12}O_6$
y otros compuestos orgánicos
CO_2
[H]
ENTROPÍA
energía bioquímica y calor
H_2O
O_2
O_2
H_2O
organismos fototrofos productores de O_2
organismos organotrofos aeróbicos

Al hablar del ciclo del carbono ya hemos contrapuesto dos procesos: **la fotosíntesis con una fijación** de anhídrido carbónico y una liberación de oxígeno y la **mineralización** de la materia orgánica con consumo de oxígeno y liberación de anhídrido carbónico. Estos dos procesos se contraponen. Los aspectos más importantes en el **intercambio de masas** los constituyen el paso del carbono de un compuesto gaseoso e inorgánico a un compuesto sólido o semisólido orgánico, así como el proceso inverso. No obstante, si se consideran ambos procesos desde el punto de vista del **cambio de energía**, es decir de la transformación de energía, el carbono tiene una importancia muy inferior a la del hidrógeno. J.R. Meyer ya decía (1848): "Las plantas capturan una fuerza, la luz, y producen otra fuerza, la diferencia química" (se entiende por "fuerza" la "energía"). Mediante la fotosíntesis la energía radiante del sol se transforma en energía química, al hidrolizarse el agua en oxígeno e hidrógeno y después al entrar a formar parte el carbono (procedente del anhídrido carbónico) de un compuesto metaestable (esquema). La parte predominante del hidrógeno estabilizado de esta forma se manifiesta en forma de hidratos de carbono. Esta diferencia de potencial entre el hidrógeno y el oxígeno que producen las plantas constituye la fuente de energía de todos los organismos organotrofos aeróbicos. Estos organismos vuelven a liberar hidrógeno a partir de un compuesto orgánico y entonces forman agua con el oxígeno mediante una reacción "bioquímica del gas detonante" y la liberan con la consiguiente producción de energía. Esta oxidación del hidrógeno se lleva a cabo escalonadamente de modo que la energía que se va liberando pueda irse transformando en energía bioquímica. Considerado globalmente, el sistema "plantas fototrofas-organismos organotrofos", interviene en el proceso de transformación de la energía luminosa en calor y hace que el incremento de entropía sea más lento.

7.1 Bases

Metabolismo y sus vías. Tanto en crecimiento como en reposo, las células dependen de la constante aportación de energía. La célula viva constituye un estado altamente ordenado de la materia. No sólo se requiere energía para conseguir este orden sino también para mantenerlo. La energía necesaria para mantener este estado vivo, así como para sintetizar los componentes celulares, la obtiene el organismo con el metabolismo, es decir con la transformación controlada en el interior de la célula de los distintos compuestos. Las fuentes de energía están constituidas por las sustancias nutritivas que se toman del medio. Estas sustancias son transformadas en el interior de la célula mediante una serie de reacciones enzimáticas consecutivas que forman parte de **vías metabólicas específicas**. Las vías metabólicas cumplen dos funciones esenciales: proporcionan los **sillares** para la formación de los componentes celulares y proporcionan la **energía** necesaria para las nuevas síntesis, así como para otros procesos que requieran energía.

Las transformaciones de la materia que se efectúan en el interior de la célula (**metabolismo**) y que dan lugar a la síntesis de material celular a partir de sustancias nutritivas sencillas, como por ejemplo la glucosa, los ácidos grasos de cadena larga o también los compuestos aromáticos, pueden separarse fácilmente en tres capítulos principales. En primer lugar se hidrolizan las sustancias nutritivas en compuestos más sencillos (**degradación = catabolismo**) y a continuación son transformadas mediante las reacciones del **metabolismo intermediario** o **anfibolismo** en una serie de ácidos orgánicos y de ésteres fosfóricos. Estas dos vías metabólicas presentan múltiples imbricaciones. La multiplicidad de compuestos de bajo peso molecular constituye los sustratos a partir de los cuales son sintetizados los componentes básicos de la célula. Se denominan **componentes básicos** los aminoácidos, las bases púricas y pirimidínicas, los fosfatos de los azúcares, los ácidos orgánicos y otros metabolitos. Son los productos finales de largas cadenas biosintéticas. A partir de estos compuestos básicos se sintetizan las **macromoléculas** poliméricas (ácidos nucleicos, proteínas, sustancias de reserva, componentes de la pared celular, etc.) que constituyen la célula. Estas dos partes de la biosíntesis de los compuestos celulares, la síntesis de los compuestos elementales y la síntesis de polímeros, se agrupan con el término **metabolismo sintético** o **anabolismo** (véase Fig. 7.1).

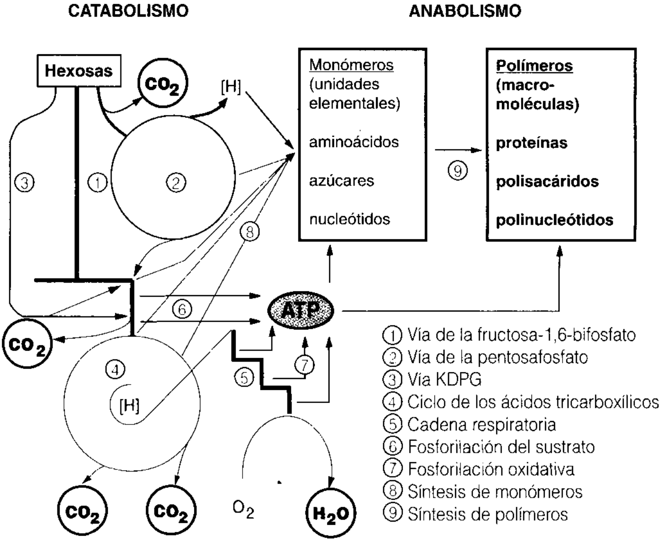

CATABOLISMO
ANABOLISMO
Hexosas
CO_2
[H]
Monómeros (unidades elementales)
aminoácidos
azúcares
nucleótidos
Polímeros (macro-moléculas)
proteínas
polisacáridos
polinucleótidos
③
①
②
⑧
⑨
ATP
⑥
CO_2
④
[H]
⑤
⑦
CO_2
CO_2
O_2
H_2O
① Vía de la fructosa-1,6-bifosfato
② Vía de la pentosafosfato
③ Vía KDPG
④ Ciclo de los ácidos tricarboxílicos
⑤ Cadena respiratoria
⑥ Fosforilación del sustrato
⑦ Fosforilación oxidativa
⑧ Síntesis de monómeros
⑨ Síntesis de polímeros

Fig. 7.1 Esquema del metabolismo en el que se representa el proceso de degradación de las hexosas mediante células que utilizan el tipo de respiración aeróbica.

Unidad bioquímica. El principio de la "unidad de la bioquímica" es uno de los pocos dogmas que todavía se mantiene en nuestro siglo. Este principio nos dice que la bioquímica de todos los seres que pueblan la Tierra es básicamente idéntica. Este principio se refiere por ejemplo a la uniformidad de los componentes celulares, incluida la rotación óptica, la universalidad del ATP como unidad elemental de la energía biológica, la universalidad del código genético así como la universalidad de la glucólisis y de la cadena respiratoria. Las principales vías del metabolismo también son prácticamente idénticas en todos los seres vivos que pueblan el planeta. Únicamente en algunos grupos de bacterias los esquemas básicos están algo modificados, de modo que algunos pasos se han alargado mientras que otros se han hecho más breves o incluso han llegado a atrofiarse. Los planes del metabolismo de los microorganismos pueden reducirse con bastante facilidad a un esquema común a todos ellos. Podemos suponer que las vías metabólicas han ido surgiendo a lo largo de un complejo proceso de evolución y que el aparato químico típico de los organismos aerobios sólo apareció cuando empezó a disponerse de oxígeno suficiente en la atmósfera. Actualmente resulta difícil saber si la reducción de las vías metabólicas constituye una característica primitiva o por el contrario es un rasgo bastante evolucionado de los organismos.

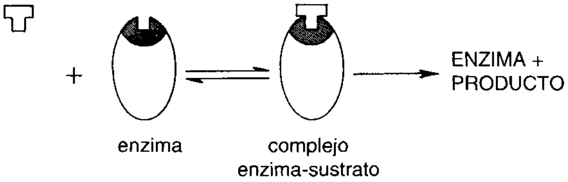
Degradación de los hidratos de carbono. Como ya se ha dicho antes en el ciclo del carbono, los hidratos de carbono constituyen en cuanto a masa los productos predominantes de la fotosíntesis vegetal. Constituyen al mismo tiempo los nutrientes más extendidos de la mayoría de microorganismos, por lo que a partir de ahora consideraremos la glucosa como el sustrato del metabolismo celular. La utilización como sustancia nutritiva de otros compuestos será considerada más adelante (pág. 453 y sig.). Por lo general las macromoléculas son hidrolizadas en el exterior de la célula por acción de enzimas segregados (exoenzimas) y son introducidas en la célula en forma de monómeros o de dímeros.

Las **hexosas** tras unos pasos previos de transformación son hidrolizadas en dos mitades; los productos de esta hidrólisis se convierten en ácido pirúvico; el ácido pirúvico ocupa una posición clave en el metabolismo intermediario y constituye el punto de partida de numerosas vías anabólicas y catabólicas. Mediante la descarboxilación del ácido pirúvico se forman compuestos con dos átomos de carbono que se unen a continuación con la molécula aceptora adecuada (ácido oxalacético) y entran a formar parte del **ciclo de los ácidos tricarboxílicos (CAT)** o **del ácido cítrico** y mediante una serie de reacciones escalonadas son oxidados hasta anhídrido carbónico; los átomos de hidrógeno (o equivalentes de reducción) que se liberan en los pasos que suponen una deshidrogenación entran a formar parte de la cadena respiratoria productora de ATP (fosforilación oxidativa). Un compuesto de dos átomos de carbono (ácido acético activado = acetilcoenzima A) da lugar al recorrer el CAT a dos moléculas de CO_2 y a cuatro veces 2[H]. Mediante estas reacciones puede obtenerse el balance del CAT.

Sin embargo, entre los compuestos intermediarios del CAT se encuentran diversos ácidos orgánicos que constituyen los productos iniciales de varias cadenas biosintéticas (2-oxoglutarato, succinato, oxalacetato). El CAT no constituye pues únicamente una oxidación terminal de las sustancias nutritivas sino que es también un gran distribuidor y como tal también suministra los productos iniciales para la síntesis de los compuestos elementales de la célula. Si estos ácidos fuesen constantemente eliminados del ciclo, no podría regenerarse la molécula aceptora y no se detendría. Mediante las denominadas **reacciones complementarias (secuencias o vías anapleróticas)** se consigue que el número de compuestos intermediarios que se integran secundariamente al CAT iguale a la pérdida que ocasionan los procesos biosintéticos. Estas secuencias anapleróticas son especialmente importantes para aquellos organismos que crecen en presencia de compuestos de carbono sencillos (compuestos con tan sólo uno o dos átomos de carbono) o en presencia de otros sustratos que puedan ser fácilmente degradados hasta dichos compuestos.

La función de los enzimas. En la célula las sustancias se transforman con ayuda de enzimas. De la transformación de un metabolito en otro es responsable un enzima específico. Los enzimas son proteínas y su misión es catalizadora. El reconocimiento del metabolito adecuado, la catálisis y la regulación de la actividad catalítica constituyen las características funcionales esenciales de una proteína enzimática.

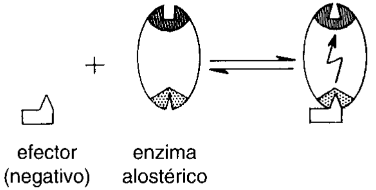
Las transformaciones catalizadas enzimáticamente se inician mediante la unión del metabolito, esto es, del sustrato enzimático, a la proteína enzimática. Por lo general el enzima sólo actúa sobre un metabolito, el sustrato, y cataliza la transformación del mismo en un segundo metabolito hasta que se alcanza el equilibrio. Cada enzima se caracteriza pues por una determinada especificidad por el sustrato (sólo actúa sobre un metabolito y el producto de su transformación) y por una determinada especificidad de acción (tan sólo cataliza uno de los múltiples procesos de transformación que puede sufrir un metabolito). El **reconocimiento del sustrato** por parte del enzima se efectúa en el curso de la unión con el mismo. La unión del sustrato con el enzima se efectúa en un punto completamente determinado del enzima, su "centro catalítico". Las propiedades estéricas del sustrato, así como su carga, son las características que permitirán su reconocimiento por parte del enzima. Concuerda con el enzima de la misma forma que la "llave y la cerradura".



Las proteínas enzimáticas actúan como **biocatalizadores** y disminuyen la energía de activación. A temperaturas normales la transformación química del metabolito se lleva a cabo en presencia del enzima. El enzima permite, pues, que se produzcan transformaciones que en su ausencia sólo se efectuarían calentando considerablemente los productos o en condiciones no fisiológicas que la célula es incapaz de soportar.

La velocidad de una reacción catalizada enzimáticamente es aproximadamente 10 órdenes de magnitud mayor que una reacción no enzimática; el incremento de la velocidad según el factor 10^{10} acorta el tiempo medio de una reacción de 300 años a un segundo.

Una característica muy esencial de los enzimas y que los bioquímicos sólo descubrieron durante el último decenio es la **modificabilidad de su actividad catalítica**. Esta posibilidad de regulación de la actividad catalítica ofrece por lo menos una de las posibles aclaraciones de la armonía que reina en el metabolismo de las células. Por lo menos la actividad de algunos enzimas (los que intervienen en una vía sintética específica) es regulable. Estos enzimas no tan sólo reconocen (en el centro catalítico) el metabolito que constituye su sustrato, sino que también pueden reconocer, gracias a otro centro, el producto final correspondiente de la cadena biosintética o bien otros compuestos de bajo peso molecular que ejercen una influencia muy significativa sobre la actividad enzimática. Estos enzimas presentan un segundo punto de unión, el centro regulador. Tiene que imaginarse que el producto final u otros metabolitos, también llamados efectores, se unen al centro catalítico y de este modo se produce un cambio en la actividad catalítica. Los productos finales actúan como efectores negativos. Los efectores positivos provocan un incremento en la actividad enzimática. De este modo la concentración de los metabolitos efectores es decisiva para la actividad enzimática y también para la velocidad con que se llevan a cabo los procesos metabólicos catalizados por esos enzimas. Los efectores no presentan nada en común en cuanto a su estructura con los sustratos enzimáticos; presentan una estructura espacial (estérica) distinta; se habla pues de efectores "alostéricos" y los puntos de unión sensibles a los reguladores se denominan también "centros alostéricos".



Coenzimas y grupos prostéticos. En la asimilación y transferencia de los fragmentos de los sustratos, p. ej. hidrógeno, grupos metilo, grupos amina, etc., colaboran con las proteínas enzimáticas otros compuestos de bajo peso molecular, los coenzimas y grupos prostéticos (Tab. 7.1; Fig. 7.2). Están más o menos ligados a los enzimas. Se trata de sustancias que reciben un fragmento del sustrato y que vuelven a disociarse del mismo para transferirlo a otra proteína enzimática que actúa sobre un segundo compuesto; se habla de coenzimas (o mejor de cosustratos o metabolitos transportadores). Si estos compuestos de bajo peso molecular están íntimamente unidos a la proteína enzimática y captan y liberan un fragmento del sustrato sin separarse de la proteína se habla de grupos prostéticos de dicha proteína enzimática.

Tab. 7.1 Coenzimas y grupos prostéticos, su función como transportadores de hidrógenos, radicales o electrones y sus relaciones con las vitaminas.

Coenzima o grupo prostético*		Función: transporte de	Vitamina
NAD(P)	(244)	hidrógeno, e^-	ácido nicotínico
FMN	(262)	hidrógeno, e^-	riboflavina
FAD	(242)	hidrógeno, e^-	riboflavina
UQ	(262)	hidrógeno, e^-	–
PQQ	(242)	hidrógeno, e^-	PQQ
F_{420}	(356)	hidrógeno, e^-	–
F_{430}	(356)	hidrógeno, e^-	–
Citocromos	(262)	e^-	derivados del hemo
Biotina	(242)	grupos carboxilo	biotina
Fosfato de piridoxal	(242)	grupos amino	piridoxina
Tetrahidrofolato	(242)	grupos formilo	folato, 4-hidroxibenzoato
Coenzima A	(242)	grupos acilo	pantotenato
Coenzima M	(356)	grupos metilo	–
Liponato	(242)	grupos acilo e hidrógeno	liponato
Tiaminadifosfato**	(242)	grupo aldehído	tiamina
Coenzima B_{12}	(242)	traslación de carboxilos, grupos metilo	cobalamina
Metanopterina	(356)	grupos formilo, metenilo metilo	–
HTP	(356)	grupos metilo	–
Metanofurano	(356)	grupos carboxílico y formilo	–

* Las cifras entre paréntesis indican las páginas en las que se representan las fórmulas

** = Tiaminapirofosfato = TPP

Los coenzimas tienen una significación especial porque muchos organismos son incapaces de sintetizarlos y tienen que tomarse con la alimentación como vitaminas. Muchas bacterias lácticas, bacterias de aguas y suelos, así como otros unicelulares requieren como suplemento para el crecimiento alguna de las vitaminas o precursores indicados en la tabla 6.3.

La transformación de energía. Las vías metabólicas que se han esquematizado (glucólisis, ciclo de los ácidos tricarboxílicos y cadena respiratoria) provocan la oxidación del azúcar hasta anhídrido carbónico y agua. La energía liberada es igual a la que se liberaría por combustión del azúcar. El que la oxidación de la glucosa se efectúe en numerosas reacciones catalizadas enzimáticamente y teóricamente reversibles, permite que la energía liberada se convierta en energía bioquímicamente utilizable, sin que se produzca un incremento de la temperatura durante la reacción.

En muchas reacciones del metabolismo sólo se liberan pequeñas cantidades de energía. Estas cantidades mínimas son útiles para la célula en tanto

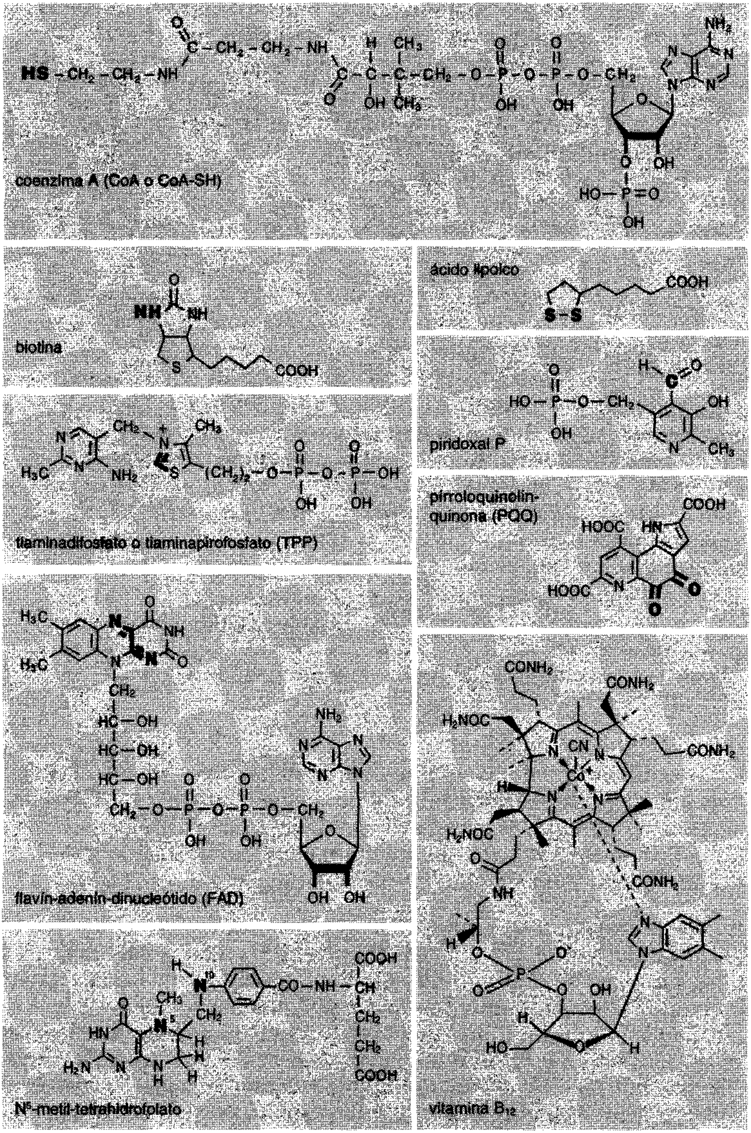

coenzima A (CoA o CoA-SH)
HS
biotina
ácido lipoico
COOH
S-S
tiaminadifosfato o tiaminapirofosfato (TPP)
piridoxal P
pirroloquinolín-quinona (PQQ)
HOOC
flavín-adenín-dinucleótido (FAD)
CONH₂
H₂NOC
CN
Co⁺
N⁵-metil-tetrahidrofolato
vitamina B₁₂

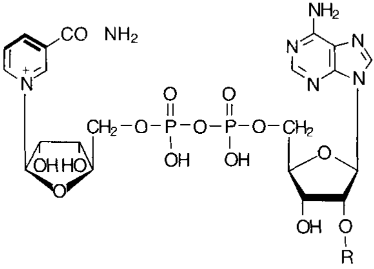
Fig. 7.2 Fórmulas estructurales de algunos coenzimas y grupos prostéticos. Los grupos reaccionantes se han marcado en negritas.

que el equilibrio de los productos que participan en la reacción se encuentra desplazado hacia los productos de la reacción. En la transformación de algunos productos intermedios que se efectúa con liberación de una cantidad de energía libre superior ($-\Delta G$ = 40-60 kJ/mol o de 10-15 kcal/mol), esta energía se conserva en forma de ATP mediante la **fosforilación del sustrato** y de este modo puede ser utilizada en otras reacciones que consuman energía. En la producción de ATP participan, pues, tanto los sustratos (compuestos intermediarios) como los enzimas. No obstante, el exceso de energía obtenida en la oxidación de los nutrientes se transforma en energía utilizable bioquímicamente (ATP) mediante una maquinaria propia de la producción de energía: mediante la **fosforilación en el transporte de electrones** que se lleva a cabo en la cadena respiratoria.

Metabolitos. Incluso con un conocimiento superficial de los compuestos que participan en las reacciones del metabolismo sobresale el hecho de que muchos compuestos se encuentran en estado fosforilado, esto es, en forma de ésteres fosfóricos. Los compuestos intermediarios no fosforilados presentan grupos carboxilo o bien grupos básicos ionizables. Parece pues que los enzimas sólo pueden actuar sobre metabolitos con grupos ionizados, esto es, cargados. Las moléculas o grupos no cargados se hallan siempre enlazados a coenzimas o a grupos prostéticos; algunos forman bases de SCHIFF con el aminoácido básico lisina presente en el centro activo de la proteína enzimática. Tan sólo los compuestos situados al comienzo o al final de las vías metabólicas, esto es, muchos sustratos y algunos productos de secreción (glucosa, fructosa, etanol, acetona, isopropanol, butanol, glicerina y otros) no están ionizados. Sin considerar la posibilidad de generalización aún está sin contestar la pregunta de si la presencia de compuestos intermediarios ionizados está relacionada con las funciones enzimáticas o con una posibilidad de almacenar metabolitos en la célula.

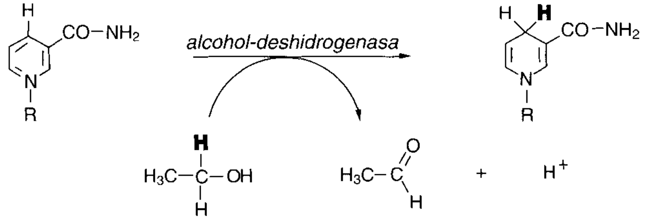
Deshidrogenación y piridinnucleótidos. La oxidación de los compuestos orgánicos se efectúa mediante la liberación de electrones. Los electrones pasan del dador de electrones al aceptor de electrones. En las oxidaciones biológicas a partir de un sustrato se transfieren por lo general dos electrones simultáneamente, con lo que se separan del sustrato dos protones (H^+). Se denomina **deshidrogenación** a esta oxidación de un sustrato con liberación de dos átomos de hidrógeno. Con frecuencia se utilizan como sinónimos los términos **dador de H** y **dador de electrones**, así como **receptor de H** y **aceptor de electrones**, **oxidación** y **deshidrogenación**, **reducción** e **hidrogenación**.

Las proteínas enzimáticas que separan átomos de hidrógeno del sustrato se denominan *deshidrogenasas* y para nombrarlas se tiene en cuenta el dador de hidrógeno (*lactato-deshidrogenasa, malato-deshidrogenasa,* etc.). Muchas *deshidrogenasas* transfieren esos átomos de hidrógeno liberados a uno de los dos coenzimas *nicotinamidadenindinucleótido* (NAD^+) o *fos-*



R = H : NAD
R = PO_3H_2 : NADP

fato de nicotinamidadenindinucleótido ($NADP^+$). El grupo determinante de la función coenzimática es la amida del ácido nicotínico. Un átomo de hidrógeno es transferido con su par de electrones del sustrato (en forma de ion hidrógeno) al anillo piridínico, el segundo átomo de hidrógeno pasa a la solución en forma de protón. Esta transferencia del hidrógeno es estereospecífica; algunos enzimas (*alcohol-deshidrogenasa, lactato-deshidrogenasa*) transfieren el átomo de hidrógeno a la posición (A^-) del anillo piridínico, otras (*triosafosfato-deshidrogenasa*) a la posición (B^-).



NAD^+ + etanol ——→ acetaldehído + NADH + H^+

Una deshidrogenación reversible de ese tipo también puede escribirse abreviadamente de la siguiente forma:

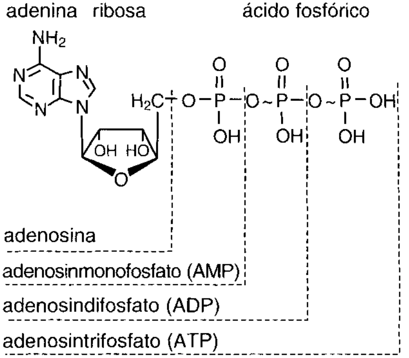
$$CH_3\text{–}CH_2OH + NAD \leftrightharpoons CH_3\text{–}CHO + NADH_2$$

Las formas reducidas de esos dos coenzimas presentan un máximo de absorción a 340 nm, que no presentan las formas oxidadas. Por lo tanto resulta fácil seguir la reducción y oxidación de esos dos coenzimas si se sigue el cambio de absorción a esa longitud de onda. Este fenómeno constituye la base de muchos métodos ópticos de determinación de actividad enzimática.

Ambos coenzimas son fácilmente disociables, abandonando pues la proteína *deshidrogenasa* y transfiriendo el hidrógeno a otro aceptor de hidrógeno después de haberse unido a otra *deshidrogenasa.* Debido a su función en el transporte de hidrógeno se les denomina también "metabolitos transportadores". El $NADH_2$ transfiere preferentemente el hidrógeno a los precursores de los productos finales de la fermentación o bien interviene en la cadena respiratoria, mientras que el $NADPH_2$ interviene preferentemente en los pasos reductores de los procesos biosintéticos.

ATP y otros compuestos ricos en energía. Los procesos que consumen energía se llevan a cabo en la célula gracias al trifosfato de adenosina (o adenosintrifosfato) (ATP). El ATP constituye la forma química en que se almacena y se utiliza la energía producida por la célula en la fotosíntesis, por oxidación o por fermentación. **El ATP constituye el transportador universal de energía química de las reacciones que producen energía a las reacciones que consumen energía** ("la moneda internacional en el mercado energético de la célula") y se utiliza en procesos tan heterogéneos como la síntesis de compuestos elementales y macromoléculas, el movimiento y la regulación osmótica. Los enlaces pirofosfóricos entre los grupos fosfato son enlaces "ricos en energía", esto es, presentan un elevado **potencial en la transferencia de grupos.** Con otras palabras: para formar esos enlaces se requiere más energía que para formar un enlace estérico normal; inversamente, al hidrolizarse se libera más energía (actuando el agua como hidrolítico unas $\Delta G_0' \simeq -30$ kJ) o bien se almacena en los productos de la reacción (Tab. 7.2).

ATP como coenzima en la activación de metabolitos. Muchos compuestos intermediarios tienen que ser activados por transferencia de grupos a fin de poder reaccionar. En esta activación se utilizan tres posibles modos de hidrólisis del ATP (pág. 246):



Tab. 7.2 Compuestos "ricos en energía" y "pobres en energía" de interés bioquímico. Se da la energía libre de la hidrólisis a pH 7,0 y en condiciones estándar $-\Delta G_0'$.

Sustrato	$-\Delta G_0'$ (kJ)	(kcal)	Sustrato	$-\Delta G_0'$ (kJ)	(kcal)
Acetilfostato	44,0	10,5	Glucósido	12,6	3,0
Acetoacetil-CoA	44,0	10,5	Sacarosa	27,6	6,6
Acil-AMP	55,7	13,3	UDP-Glucosa	31,8	7,6
Fosfocreatina	37,7	9,0	Aldosa-1-fosfato	20,9	5,0
Fosfoenolpiruvato	54,5	13,0	ATP (→ DP + P)	31,0	7,4
Éster fosfórico sencillo	12,6	3,0	ATP (→ AMP + PP)	31,8	7,6

Los azúcares son activados convirtiéndose en azúcares-fosfato:

$$\text{glucosa} + \text{ATP} \longrightarrow \text{glucosafosfato} + \text{ADP}$$

La ribosa-5-fosfato es activada por transferencia de pirofosfato (restos difosfato):

$$\text{ribosa-5-fosfato} + \text{ATP} \longrightarrow \text{fosforribosildifosfato} + \text{AMP}$$

Algunos ácidos orgánicos, todos los aminoácidos y el sulfato inorgánico son activados por transferencia del grupo AMP que resulta de la hidrólisis del ATP dejando libre un pirofosfato:

$$\begin{aligned} \text{ácido graso} + \text{ATP} &\longrightarrow \text{acil-AMP} + \text{difosfato} \\ \text{aminoácido} + \text{ATP} &\longrightarrow \text{aminoacil-AMP} + \text{difosfato} \\ \text{sulfato} + \text{ATP} &\longrightarrow \text{AMP-sulfato} + \text{difosfato} \end{aligned}$$

A fin de permitir que las reacciones continúen hasta el final y de garantizar totalmente la transformación, el pirofosfato que se va formando es hidrolizado por medio de una *pirofosfatasa* y de este modo se evita que se alcance un equilibrio. La activación de esos metabolitos le cuesta a la célula dos enlaces ricos en energía.

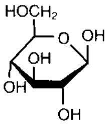
Estas indicaciones pueden resultar suficientes para poner en claro el significado universal del ATP y para permitir comprender los distintos tipos de metabolismo de las bacterias. Los distintos tipos de metabolismo tienen que ser considerados desde el punto de vista de que la célula intenta conseguir en unas condiciones ambientales determinadas el máximo de ATP a partir de las sustancias nutritivas de que dispone.

Regeneración del ATP. Existen tres procesos a través de los cuales se regenera el ATP: la fosforilación fotosintética (pág. 428, 435 y sig.), la fosforilación oxidativa en la cadena respiratoria (véase pág. 268) y la fosforilación a nivel de sustrato (pág. 250). Los dos primeros procesos tienen en común que el ATP se forma mediante una *ATP-sintasa*. Fosforilaciones a nivel de sustrato pueden tener lugar en varias transformaciones del metabolismo intermediario. Las reacciones más importantes del metabolismo de los hidratos de carbono en cuanto a la regeneración del ATP están catalizadas por la *fosfoglicerato-quinasa*, la *piruvato-quinasa* y la *acetato-quinasa*. Las bacterias y levaduras fermentadoras de azúcares dependen exclusivamente de estos enzimas para regenerar el ATP. En todos los procesos de fosforilación se utiliza al adenosindifosfato (ADP) como aceptor de fosfato (con pocas excepciones). El adenosinmonofosfato (AMP) ha de transformarse en ADP con ayuda de ATP y de la *adenil-quinasa* (AMP + ATP $\rightleftharpoons$ 2 ADP), antes de poder ser fosforilado a ATP.

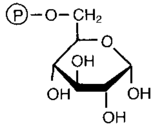
A continuación se exponen brevemente las cuatro reacciones sucesivas principales de la degradación de la glucosa, la rotura en moléculas C_3 preliminar, el ciclo de los ácidos tricarboxílicos, la oxidación del piruvato y la cadena respiratoria, así como sus funciones. Se profundizará en algunos detalles importantes para el entendimiento de algunos procesos metabólicos especiales y derivados. Por lo demás, para profundizar en la fisiología del metabolismo y para el conocimiento de la bioquímica de los microorganismos es imprescindible la consulta de un texto de bioquímica.

7.2 Vías de degradación de las hexosas

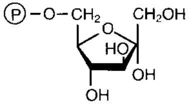
Varias vías conducen la glucosa hasta moléculas de tres átomos de carbono (C_3), entre ellas el piruvato, uno de los compuestos intermediarios del metabolismo más importante. La vía degradativa más extendida pasa por la fructosa-1,6-bifosfato (FBP) y se denomina vía FBP, degradación glucolítica, glucolisis, o según los investigadores principales que la establecieron vía de EMBDEN-MEYERHOF-PARNAS (Fig. 7.3). Una serie de reacciones que pueden catalizar la mayoría de los seres vivos, puede ordenarse en forma de ciclo y se conoce como vía oxidativa de la pentosafosfato, vía de la hexosamonofosfato o esquema de WARBURG-DICKENS-HORECKER (Fig. 7.4); la serie inversa de reacciones supone las reacciones esenciales para la regeneración del aceptor de CO_2 de la fijación autotrófica de CO_2. La vía de ENTNER-DOUDOROFF parece estar limitada a las bacterias, denominada también por el intermediario característico 2-ceto-3-desoxi-6-fosfo-gluconato como vía KDPG (Fig. 7.5). Otros mecanismos de degradación relacionados son de una significación más específica.



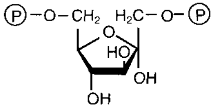
ß-D-glucosa



glucosa-6-fosfato

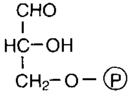


fructosa-6-fosfato



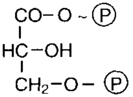
fructosa-1,6-bifosfato

En primer lugar la glucosa es fosforilada en la célula en la posición 6, actuando una *hexoquinasa* como enzima y el ATP como dador de fosfato. La **glucosa-6-fosfato** (G-6-*P*) es la forma metabólicamente activa de la glucosa en la célula, y el punto de partida de las tres vías de degradación mencionadas.



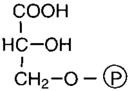
$$\begin{array}{l}\mathrm{CHO}\\ |\\ \mathrm{HC{-}OH}\\ |\\ \mathrm{CH_2{-}O{-}}\textcircled{P}\end{array}$$

gliceraldehído-3-fosfato



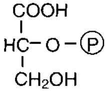
$$\begin{array}{l}\mathrm{CO{-}O}\sim\textcircled{P}\\ |\\ \mathrm{HC{-}OH}\\ |\\ \mathrm{CH_2{-}O{-}}\textcircled{P}\end{array}$$

1,3-bisfosfoglicerato



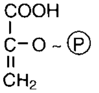
$$\begin{array}{l}\mathrm{COOH}\\ |\\ \mathrm{HC{-}OH}\\ |\\ \mathrm{CH_2{-}O{-}}\textcircled{P}\end{array}$$

3-fosfoglicerato



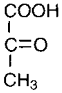
$$\begin{array}{l}\mathrm{COOH}\\ |\\ \mathrm{HC{-}O{-}}\textcircled{P}\\ |\\ \mathrm{CH_2OH}\end{array}$$

2-fosfoglicerato



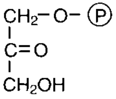
$$\begin{array}{l}\mathrm{COOH}\\ |\\ \mathrm{C{-}O}\sim\textcircled{P}\\ \|\\ \mathrm{CH_2}\end{array}$$

fosfoenolpiruvato



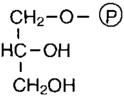
$$\begin{array}{l}\mathrm{COOH}\\ |\\ \mathrm{C{=}O}\\ |\\ \mathrm{CH_3}\end{array}$$

piruvato



$$\begin{array}{l}\mathrm{CH_2{-}O{-}}\textcircled{P}\\ |\\ \mathrm{C{=}O}\\ |\\ \mathrm{CH_2OH}\end{array}$$

dihidroxiacetona-fosfato



$$\begin{array}{l}\mathrm{CH_2{-}O{-}}\textcircled{P}\\ |\\ \mathrm{HC{-}OH}\\ |\\ \mathrm{CH_2OH}\end{array}$$

3-glicerofosfato

7.2.1 Vía de la fructosa-1,6-bifosfato (glucolisis)

En la vía de la fructosabifosfato se prepara la rotura de la glucosa-6-fosfato mediante una isomerización a fructosa-6-fosfato (F-6-*P*) mediante una *glucosa-fosfato-isomerasa*, y por último se fosforila con ATP en la posición 1 mediante la *6-fosfofructo-quinasa*. La fructosa-1,6-bifosfato formada es hidrolizada por la *fructosa-bifosfato-aldolasa* a dihidroxiacetona-fosfato y gliceraldehído-3-fosfato. Las dos triosas-fosfato están en equilibrio entre sí; la posición de equilibrio está catalizada por la *triosa-fosfato-isomerasa*. La dihidroxiacetona-fosfato puede reducirse a glicerín-fosfato mediante la *glicerín-fosfato-deshidrogenasa*, e hidrolizarse por la *glicerín-1-fosfatasa* dando glicerina y ortofosfato. No obstante, normalmente el fosfato de dihidroxiacetona formado pasa también a gliceraldehído-3-fosfato y es oxidado.

Desde el punto de vista de la obtención de energía la deshidrogenación que sigue es el paso más importante de esta vía de degradación y de otras reac-

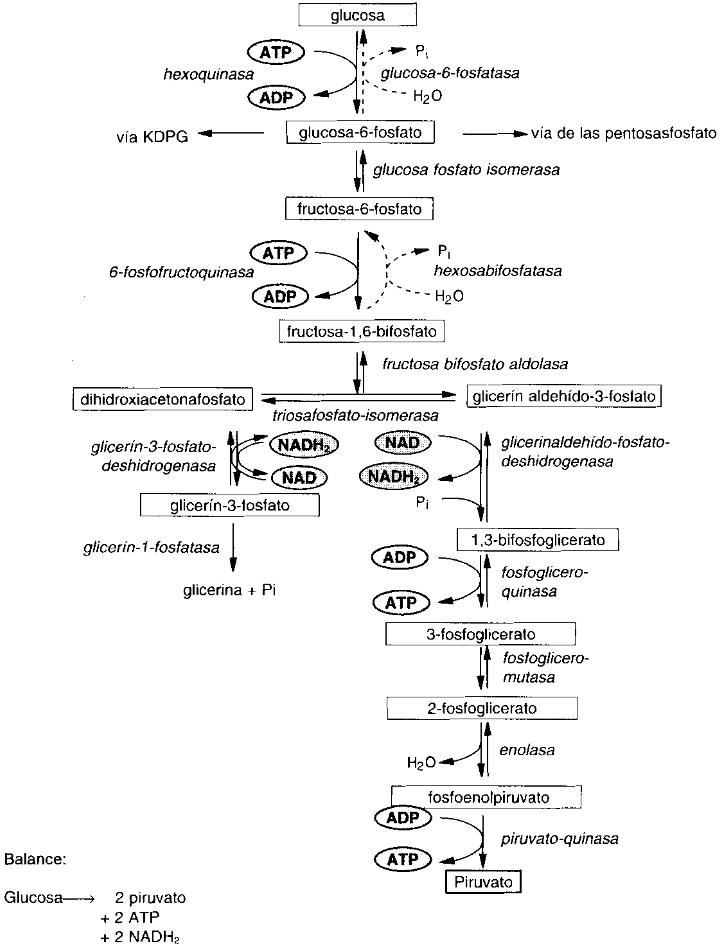
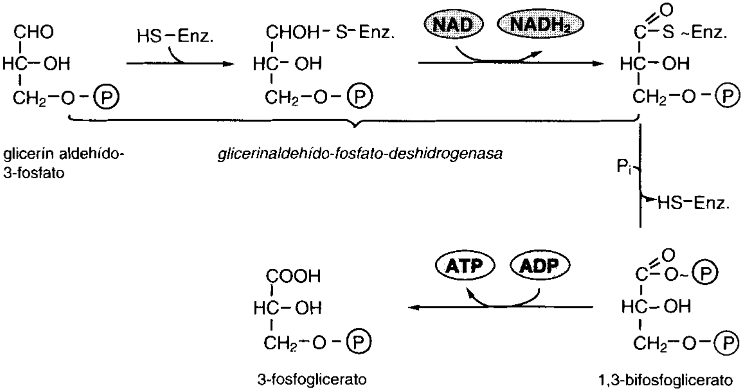

glucosa
ATP
ADP
hexoquinasa
Pi
glucosa-6-fosfatasa
H2O
vía KDPG
glucosa-6-fosfato
vía de las pentosasfosfato
glucosa fosfato isomerasa
fructosa-6-fosfato
ATP
ADP
6-fosfofructoquinasa
Pi
hexosabifosfatasa
H2O
fructosa-1,6-bifosfato
fructosa bifosfato aldolasa
dihidroxiacetonafosfato
glicerín aldehído-3-fosfato
triosafosfato-isomerasa
glicerín-3-fosfato-deshidrogenasa
NADH2
NAD
NAD
NADH2
Pi
glicerinaldehído-fosfato-deshidrogenasa
glicerín-3-fosfato
glicerín-1-fosfatasa
glicerina + Pi
1,3-bifosfoglicerato
ADP
ATP
fosfoglicero-quinasa
3-fosfoglicerato
fosfoglicero-mutasa
2-fosfoglicerato
H2O
enolasa
fosfoenolpiruvato
ADP
ATP
piruvato-quinasa
Piruvato
Balance:
Glucosa ⟶ 2 piruvato
+ 2 ATP
+ 2 NADH2

Fig. 7.3 Vía de la fructosa-1,6-bifosfato de degradación de la glucosa (glucolisis).

ciones que conducen al gliceraldehído-3-fosfato. Parte de la energía liberada en la oxidación del gliceraldehído-3-fosfato a 3 fosfoglicerato (ΔG_0'= – 67 kJ) se conserva en un enlace fosfato rico en energía. En primer lugar el grupo aldehído se une al grupo SH de la *gliceraldehído-fosfato deshidrogenasa*, liberándose a continuación hidrógeno que es transferido al NAD. El enlace formado acil-S-enzima es, como tioéster, rico en energía. Por fosforolisis, intercambio del grupo S-enzima con un ortofosfato, se conserva esta energía en el glicerato-1,3-bifosfato. Mediante la *fosfoglicerato-quinasa* se transfiere este grupo fosfato rico en energía al ADP, formándose 3-fosfoglicerato y ATP. Como esta fosforilación tiene lugar sobre el sustrato, se la denomina **fosforilación a nivel de sustrato.** La oxidación del gliceraldehído-3-fosfato depende de la presencia de la proteína enzimática, así como del ortofosfato y del adenosindifosfato. Si no están presentes se detiene aquí la degradación de la glucosa. Este hecho es de importancia en la regulación de la degradación de la glucosa ("efecto PASTEUR"; pág. 297 y sig.).


CHO
HC–OH
CH₂–O–P
HS–Enz.
CHOH–S–Enz.
HC–OH
CH₂–O–P
NAD
NADH₂
C=O –S ~Enz.
HC–OH
CH₂–O–P
glicerin aldehído-3-fosfato
gliceraldehído-fosfato-deshidrogenasa
Pi
HS–Enz.
COOH
HC–OH
CH₂–O–P
ATP
ADP
C=O –O~P
HC–OH
CH₂–O–P
3-fosfoglicerato
1,3-bifosfoglicerato

Mediante la *fosfogliceromutasa* se transforma el 3-fosfoglicerato en 2-fosfoglicerato, del que se forma fosfoenolpiruvato a través de una *enolasa* y pérdida de agua. Volvemos a encontrarnos con un éster enólico, cuyo grupo fosfato rico en energía es transferido al ADP a través de la *piruvato-quinasa* y puede conservarse. El piruvato así formado es el punto de partida de otros procesos de degradación, transformación y síntesis. Todas las reacciones de la vía de la fructosa-1,6-bifosfato son totalmente reversibles, con tres excepciones (la reacción de la *hexoquinasa*, la reacción de la *6-fosfofructo-quinasa*, y la reacción de la *piruvato-quinasa*).

Si toda la triosafosfato formada a partir de la escisión de la fructosa-1,6-bifosfato se transforma en piruvato, el balance de la degradación de la glucosa a través de la vía de la fructosa-1,6-bifosfato es la formación de 2 piruvatos, 2 (= 4 menos 2) ATP y 2 $NADH_2$.

Las dos reacciones productoras de energía que tienen lugar en la transformación de gliceraldehído-fosfato hasta piruvato, son las reacciones más importantes de los organismos anaeróbicos para la transformación de energía. Con muy pocas excepciones, en condiciones anaeróbicas todos los microorganismos que fermentan hidratos de carbono dependen de la energía que obtienen en la oxidación del gliceraldehído-fosfato hasta piruvato.

7.2.2 Vía de la pentosafosfato

En la vía de la pentosafosfato (Fig. 7.4) la glucosa-6-fosfato se deshidrogena mediante la *glucosa-6-fosfato-deshidrogenasa*, pasando el hidrógeno al NADP y formándose 6-fosfogluconolactona, compuesto que espontáneamente o de forma catalizada (*gluconolactonasa*) se hidroliza a 6-fosfogluconato. Este último es deshidrogenado mediante una *deshidrogenasa* (a 3-ceto-6-fosfogluconato) y a **ribulosa-5-fosfato** por descarboxilación. Con esto se concluye el verdadero proceso de oxidación.

Las reacciones siguientes hay que considerarlas exclusivamente como procesos de transformación de pentosasfosfato en hexosasfosfato y a la inversa. Además la vía oxidativa de la pentosafosfato puede cerrarse en un ciclo si se incluye esta serie de reacciones. La ribulosa-5-fosfato está en equilibrio con la ribosa-5-fosfato y la xilulosa-5-fosfato. La ribosafosfato es un componente importante de la síntesis de los nucleótidos y los ácidos nucleicos. Mediante la *transcetolasa* y la *transaldolasa* las pentosas fosfato se transforman en dos fructosa-6-fosfato y un gliceraldehído-3-fosfato. Por isomerización de la fructosa-6-fosfato a glucosa-6-fosfato y condensación de dos triosasfosfato en una hexosafosfato pueden cerrarse las reacciones citadas en un ciclo, en una de cuyas vueltas se forma, a partir de tres moléculas de glucosa-6-fosfato, dos moléculas de fructosa-6-fosfato, una molécula de gliceraldehído-3-fosfato, tres de CO_2 y tres veces dos $NADPH_2$. Los enzimas *glucosa-6-fosfato-deshidrogenasa* y *fosfogluconato-deshidrogenasa* de muchas bacterias, sino de todas, transfieren el hidrógeno desde sus sustratos no sólo al NADP, sino también al NAD.

El ciclo descrito constituye con toda seguridad una vía lateral, cuya importancia hay que verla en la preparación de sustancias de partida importantes (pentosasfosfato, eritrosafosfato, gliceraldehído-3-fosfato) y equivalentes de reducción ($NADPH_2$) para los procesos sintéticos. Las pentosasfosfato como etapas previas de la síntesis de nucleótidos (ácidos nucleicos) pueden proceder tanto de la deshidrogenación y descarboxilación de la glucosa-6-fosfato, como de las reacciones de la *transcetolasa* y la *transaldolasa* a partir de la fructosa-6-fosfato.

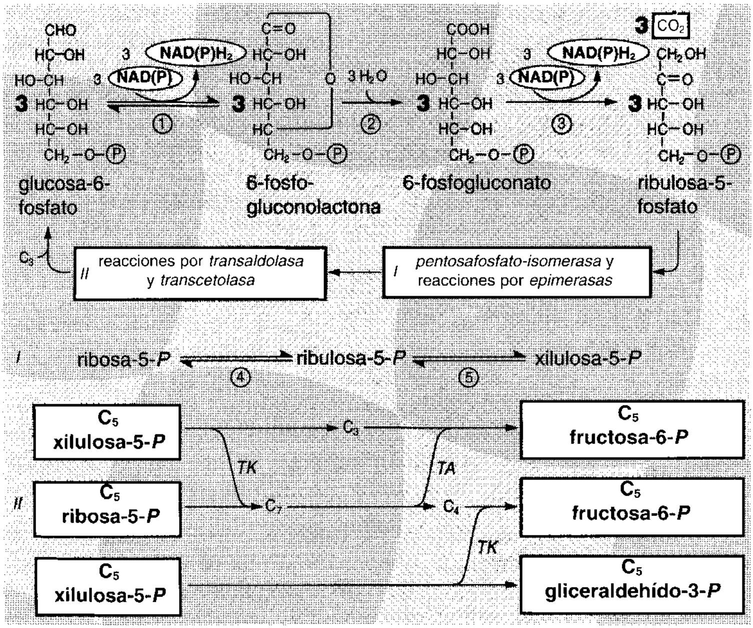

CHO
HC-OH
HO-CH
3 HC-OH
HC-OH
CH2-O-P
glucosa-6-fosfato
3 NAD(P)H2
3 NAD(P)
①
C=O
HC-OH
HO-CH
3 HC-OH
HC
O
CH2-O-P
6-fosfo-gluconolactona
3 H2O
②
COOH
HC-OH
HO-CH
3 HC-OH
HC-OH
CH2-O-P
6-fosfogluconato
3 NAD(P)H2
3 NAD(P)
③
3 CO2
CH2OH
C=O
3 HC-OH
HC-OH
CH2-O-P
ribulosa-5-fosfato
C3
II reacciones por transaldolasa y transcetolasa
I pentosafosfato-isomerasa y reacciones por epimerasas
I
ribosa-5-P
④
ribulosa-5-P
⑤
xilulosa-5-P
II
C5 xilulosa-5-P
C5 ribosa-5-P
C5 xilulosa-5-P
C3
TK
C7
TA
C4
TK
C5 fructosa-6-P
C5 fructosa-6-P
C5 gliceraldehído-3-P

Fig. 7.4 Vía de la pentosafosfato en la degradación oxidativa de la glucosa-6-fosfato. El proceso cíclico representado es el del ciclo de la pentosafosfato. Con la formación de ribulosa-5-fosfato terminan los procesos de oxidación. La ribulosa-5-fosfato se encuentra en equilibrio enzimático con la ribosa-5-fosfato y la xilulosa-5-fosfato. Estas pentosasfosfato se transforman mediante la *transcetolasa* y la *transaldolasa* en dos fructosasfosfato y un gliceraldehído-fosfato. Esta serie de reacciones es totalmente reversible y en sentido inverso está implicada en el ciclo de la ribulosabifosfato de la fijación del anhídrido carbónico, en el ciclo de la ribulosamonofosfato de la fijación del formaldehído y en otros ciclos. Enzimas implicados: (1) *glucosa-6-fosfato-deshidrogenasa*; (2) *lactonasa*; (3) *6-fosfogluconato-deshidrogenasa*; (4) *fosforribosa-isomerasa*; (5) *ribulosa-5-fosfato-3-epimerasa*; *(TK) transcetolasa*; *(TA) transaldolasa*.

7.2.3 Vía del 2-ceto-3-desoxi-6-fosfogluconato

A continuación se va a describir una de las vías más importantes del metabolismo celular. La glucosa-6-fosfato se deshidrogena inicialmente a 6-fosfogluconato, tal como se ha indicado anteriormente en la vía de la pentosafosfato. Por acción de una *fosfogluconato-deshidrasa* se libera agua con formación de **2-ceto-3-desoxi-6-fosfogluconato** (Fig. 7.5). El cetodesoxifosfogluconato se escinde en piruvato y gliceraldehído-3-fosfato

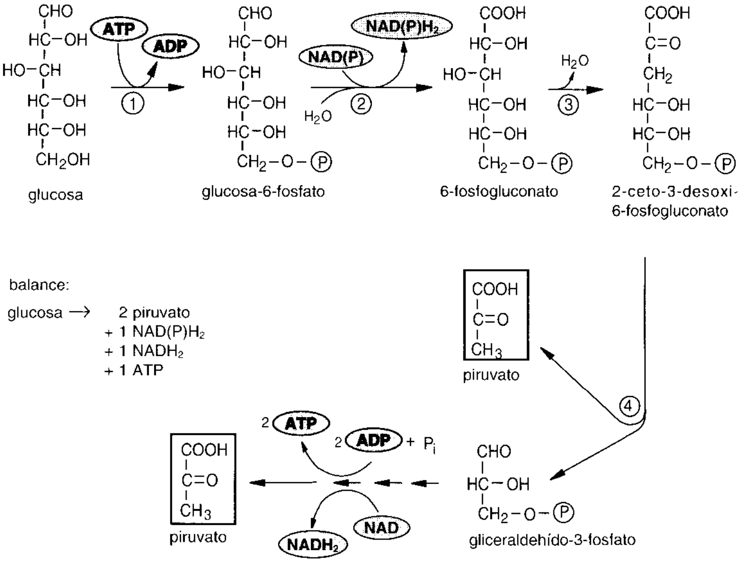

glucosa
ATP
ADP
①
glucosa-6-fosfato
NAD(P)
NAD(P)H₂
H₂O
②
6-fosfogluconato
H₂O
③
2-ceto-3-desoxi-6-fosfogluconato
balance:
glucosa ⟶ 2 piruvato + 1 NAD(P)H₂ + 1 NADH₂ + 1 ATP
piruvato
④
gliceraldehído-3-fosfato
2 ATP
2 ADP + Pᵢ
NAD
NADH₂
piruvato

Fig. 7.5 Vía del 2-ceto-3-desoxi-6-fosfogluconato (Entner-Doudoroff) de la degradación oxidativa de la glucosa. Enzimas implicados: (1) *hexoquinasa*; (2) *glucosa-6-fosfato-deshidrogenasa*; (3) *fosfogluconato-deshidrasa*; (4) *fosfo-2-ceto-3-desoxigluconato-aldolasa*. No se ha representado la 6-fosfogluconolactona que se forma como producto intermedio en la deshidrogenación de la glucosa-6-fosfato.

mediante una *aldolasa* específica. El último se oxida hasta piruvato como en la vía de la fructosabifosfato.

En lo que respecta a la producción de ATP, $NADH_2$ y $NADPH_2$ existen diferencias notables entre las vías de degradación consideradas. En la vía de la fructosabifosfato se forman por mol de glucosa en la oxidación hasta piruvato 2 mol de ATP y 2 mol de $NADH_2$, en la vía del 2-ceto-3-desoxi-6-fosfogluconato un mol de ATP, otro de $NADH_2$ y otro de $NADPH_2$. En este caso aparece en el balance un $NADPH_2$ en lugar de un ATP + $NADH_2$. Esta equivalencia está de acuerdo con la observación de que la transferencia del hidrógeno desde el $NADH_2$ al NADP por *transhidrogenasas* consume energía en muchos casos y que transcurre con gasto de ATP.

Los microorganismos se diferencian entre sí según el uso que hagan de una u otra vía (Tab. 7.3). Los enzimas de la vía de la fructosabifosfato per-

Tab. 7.3 Participación de las distintas vías de degradación de la glucosa (en %).

Especie	Vía de la fructosa-1,6-bifosfato	Vía de la pentosa-fosfato	Vía del 2-ceto-3-desoxi-6-fosfogluconato
Candida utilis	70-80	30-20	
Streptomyces griseus	97	3	
Penicillium chrysogenum	77	23	
Escherichia coli	72	28	
Bacillus subtilis	74	26	
Pseudomonas aeruginosa		29	71
Gluconobacter oxydans		100	
Pseudomonas saccharophila			100
Alcaligenes eutrophus			100

tenecen por lo general a la dotación básica de la célula, aunque en muchas bacterias la vía de la fructosabifosfato únicamente se utiliza en sentido inverso (saltando los pasos irreversibles por otros enzimas). La vía de la pentosafosfato es aparentemente también universal. La vía del 2-ceto-3-desoxi-6-fosfogluconato está muy extendida entre las bacterias; es de importancia principal en la utilización del gluconato. Así, por ejemplo, *Escherichia coli* y especies de *Clostridium* degradan la glucosa por la vía de la fructosa bifosfato, pero la vía de entrada del gluconato en el metabolismo intermediario es a través del 2-ceto-3-desoxi-6-fosfogluconato.

Los clostridios y algunas bacterias aeróbicas degradan el gluconato por una variante de la vía del 2-ceto-3-desoxi-6-fosfogluconato: el gluconato se transforma mediante la *gluconato-deshidratasa* a 2-ceto-3-desoxigluconato, y a este nivel se fosforila con ATP mediante una *cetodesoxigluconoquinasa*; el 2-ceto-3-desoxi-6-fosfogluconato se escinde por la *fosfo-2-ceto-3-desoxigluconato-aldolasa*.

7.2.4 Oxidación del piruvato

El piruvato se localiza en el centro del metabolismo intermediario y puede conducir a la síntesis de numerosos productos. Muchos organismos oxidan la mayor parte del piruvato obtenido durante el catabolismo hasta acetil-coenzima A. En el metabolismo bacteriano el papel principal lo desarrollan tres reacciones:

(1) piruvato + CoA + NAD $\longrightarrow$ acetil-CoA + $NADH_2$ + CO_2
(2) piruvato + CoA + 2 Fd $\longrightarrow$ acetil-CoA + 2 FdH + CO_2
(3) piruvato + CoA $\longrightarrow$ acetil-CoA + formiato

La reacción (1) está catalizada por el *complejo multienzimático de la piruvato-deshidrogenasa* (abreviado *piruvato-deshidrogenasa*). Este enzima está presente en todos los organismos aeróbicos y sirve predominantemente para la formación de acetil-CoA, que entra en el ciclo de los ácidos tricarboxílicos. Su función se describe posteriormente con detalle (véase Fig. 7.6).

La reacción (2) está catalizada por la *piruvato-ferredoxina-oxidorreductasa.* Este enzima tiene un papel predominante en muchas bacterias anaeróbicas, por ejemplo en los clostridios.

La reacción (3) está catalizada por la *piruvato-formiato-liasa.* Este enzima lo tienen muchas bacterias anaeróbicas que excretan formiato (véase Fermentación fórmica, pág. 313), sobre todo en las Enterobacteriáceas, pero también en las bacterias fototrofas.

En levaduras y algunas bacterias que excretan etanol hay un cuarto enzima oxidador del piruvato.

$$\text{(4) piruvato} \xrightarrow{\qquad\quad} \text{acetaldehído} + CO_2$$

Este enzima, la *piruvato-descarboxilasa* escinde al piruvato en acetaldehído y dióxido de carbono. El acetaldehído se reduce finalmente a etanol.

Deshidrogenación del piruvato por el enzima *piruvato-deshidrogenasa.* El piruvato se transforma en acetil-coenzima A y anhídrido carbónico con la participación de cofactores y mediante el *complejo multienzimático de la piruvato-deshidrogenasa* (véase reacción (1) y también la Fig. 7.6).

El complejo multienzimático puede descomponerse en tres proteínas: la *piruvato-deshidrogenasa* (E1), la *dihidrolipoamida-transacetilasa* (E2) y la *dihidrolipoamida-deshidrogenasa* (E3).

$$\text{piruvato} + \text{TPP} \xrightarrow{E1} \text{hidroxietil-TPP} + CO_2$$

$$\text{hidroxietil-TPP} + \text{liponato} \xrightarrow{E2} \text{6-S-acetildihidroliponato} + \text{TPP}$$

$$\text{acetildihidroliponato} + \text{CoA} \xrightarrow{E2} \text{acetil-CoA} + \text{dihidroliponato}$$

$$\text{dihidroliponato} + \text{NAD} \xrightarrow{E3} \text{liponato} + NADH_2$$

En la transformación inicial (en E1) el piruvato se fija en la posición 2 del anillo tiazol (1) de la tiaminapirofosfato y se libera dióxido de carbono. El hidroxietil-TPP (2) formado de esta forma reacciona con el liponato (3) unido a E2, que queda entonces reducido y mantiene unido el resto acetilo al grupo SH secundario (4). E2 cataliza entonces la transferencia del grupo acetilo al coenzima A, quedándose el dihidroliponato (5); este último se reoxida mediante E3 con reducción del NAD.

En las bacterias anaeróbicas estrictas no se encuentra el *sistema multienzimático de la piruvato-deshidrogenasa.*

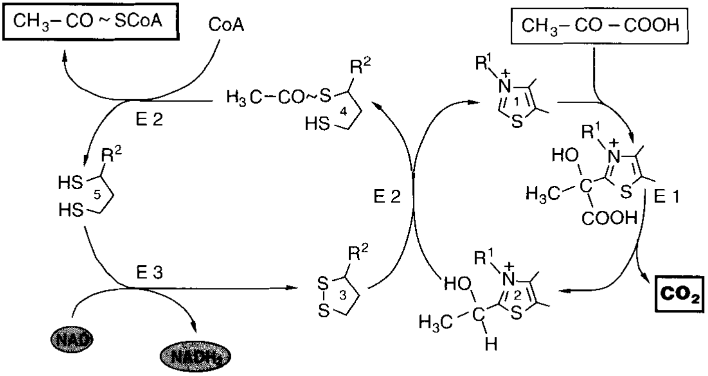


Fig. 7.6 Esquema de las reacciones implicadas en la deshidrogenación del piruvato (para aclaraciones consúltese el texto).

7.3 Ciclo de los ácidos tricarboxílicos

El ciclo de los ácidos tricarboxílicos (Fig. 7.7) se utiliza para la oxidación de la molécula de dos átomos de carbono, acetato, hasta anhídrido carbónico con liberación de hidrógeno. A través de tres de las *deshidrogenasas* implicadas se transfiere el hidrógeno al NAD(P), y a través de la *succinato-deshidrogenasa* directamente a una quinona. Los coenzimas transportan generalmente el hidrógeno a la cadena respiratoria.

La *citrato-sintasa* condensa primeramente al acetil-CoA con el oxalacetato dando citrato y liberando al coenzima A. El citrato es una molécula simétrica, pero se degrada asimétricamente. La *aconitato-hidratasa* cataliza la transformación reversible de los tres ácidos de tres carbonos:

citrato $\rightleftharpoons$ *cis*-aconitato $\rightleftharpoons$ isocitrato

La *isocitrato-deshidrogenasa* cataliza las reacciones que conducen del isocitrato al 2-oxoglutarato; hay un sistema enzimático NAD y otro NADP específicos. El oxalsuccinato permanece aparentemente unido al enzima. La *2-oxoglutarato-deshidrogenasa* cataliza una reacción análoga a la de la *piruvato-deshidrogenasa*; además de la proteína enzimática intervienen: tiaminapirofosfato, liponato, coenzima A, NAD y Mg^{2+}. El

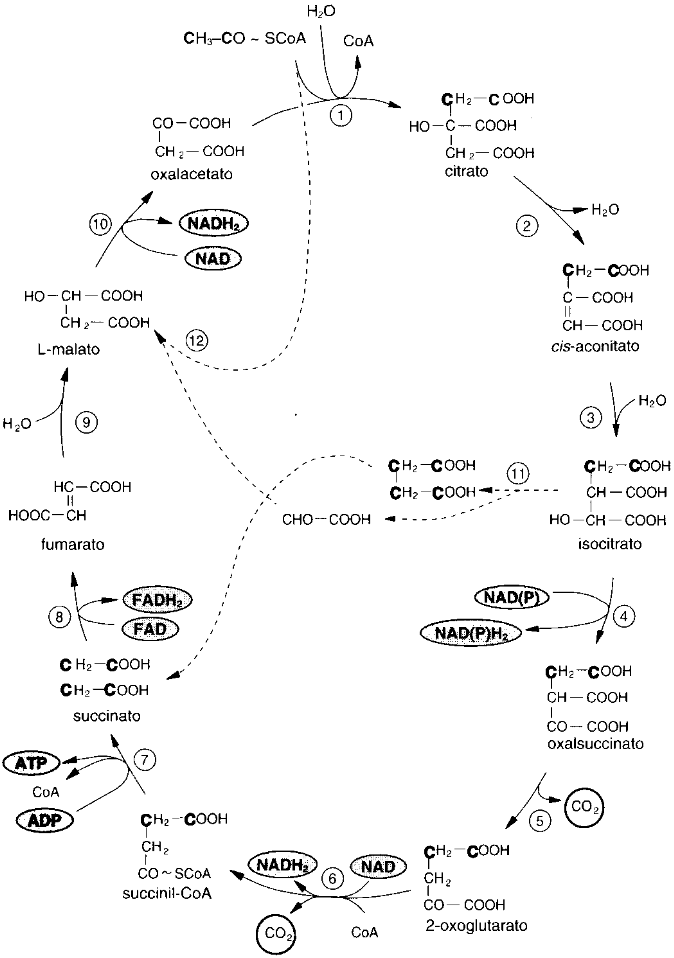

H₂O
CH₃–CO ~ SCoA
CoA
①
CO–COOH
CH₂–COOH
oxalacetato
CH₂–COOH
HO–C–COOH
CH₂–COOH
citrato
H₂O
②
CH₂–COOH
C–COOH
CH–COOH
cis-aconitato
⑩
NADH₂
NAD
HO–CH–COOH
CH₂–COOH
L-malato
⑫
③
H₂O
H₂O
⑨
HC–COOH
HOOC–CH
fumarato
CH₂–COOH
CH₂–COOH
⑪
CHO–COOH
CH₂–COOH
CH–COOH
HO–CH–COOH
isocitrato
FADH₂
FAD
⑧
NAD(P)
NAD(P)H₂
④
CH₂–COOH
CH₂–COOH
succinato
CH₂–COOH
CH–COOH
CO–COOH
oxalsuccinato
ATP
CoA
ADP
⑦
CH₂–COOH
CH₂
CO ~ SCoA
succinil-CoA
CO₂
⑤
NADH₂
NAD
⑥
CO₂
CoA
CH₂–COOH
CH₂
CO–COOH
2-oxoglutarato

Fig. 7.7 Ciclo de los ácidos tricarboxílicos. A fin de que quede clara la degradación asimétrica del citrato se han señalado en rojo los átomos de C procedentes del acetato hasta la reacción 8. El succinato es el primer compuesto simétrico. El ciclo del ácido glioxílico se indica con líneas de puntos. Enzimas implicados: (1) *citrato-sintetasa*; (2) y (3) *aconitasa*; (4) y (5) *isocitrato-deshidrogenasa*; (6) *oxoglutarato-deshidrogenasa*; (7) *succinato-tioquinasa*; (8) *succinato-deshidrogenasa*; (9) *fumarasa*; (10) *malato-deshidrogenasa*; (11) *isocitrato-liasa*; (12) *malato-sintasa.*

succinato puede liberarse directamente del succinil-CoA mediante una *CoA-acilasa*, o bien en una reacción acoplada a la fosforilación del ADP:

$$\text{succinil-CoA} + \text{ADP} + P_i \leftrightharpoons \text{Succinato} + \text{CoA} + \text{ATP}$$

La *succinato-deshidrogenasa* oxida el succinato a fumarato y transfiere los electrones a la ubiquinona y al citocromo b (Fe^{3+}). La *fumarasa* (*fumarato-hidratasa*) añade agua al fumarato; esta hidratación es estereoespecífica y conduce a 2-malato. La *malato-deshidrogenasa* la deshidrogena a oxalacetato y regenera así al aceptor de acetato. Excepto la formación de succinil-CoA todas las reacciones son reversibles.

Desde el punto de vista del balance, la degradación del acetato en el ciclo de los ácidos tricarboxílicos conduce a 2 CO_2 y 8(H^+); de ellos 6(H^+) están a nivel de los piridín nucleótidos y 2(H^+) de las flavoproteínas. Además se consigue un enlace rico en energía.

El ciclo de los ácidos tricarboxílicos no tiene sólo la función de **oxidación terminal** de los nutrientes, sino que también suministra numerosos precursores para la biosíntesis (2-oxoglutarato, oxalacetato, succinato). La utilización de estos ácidos conduciría a una deficiencia en oxalacetato como aceptor del acetil-CoA y se detendría el ciclo de los ácidos tricarboxílicos. Existen unas reacciones complementarias o secuencias anapleróticas que se encargan de equilibrar estas pérdidas de productos intermediarios del ciclo de los ácidos tricarboxílicos. Los mecanismos más importantes que suministran al ciclo ácidos dicarboxílicos de cuatro carbonos son reacciones de carboxilación del piruvato y del fosfoenolpiruvato ($C_3 + C_1 = C_4$). Las reacciones se tratan con más detalle en Ciclos auxiliares (pág. 274).

7.4 Cadena respiratoria y fosforilación en el transporte de electrones

Mientras que la mayoría de los organismos de vida anaeróbica pueden regenerar ATP únicamente por fosforilación a nivel de sustrato, los organismos que respiran son capaces de realizar una regeneración del ATP más eficaz. Disponen de un aparato especial: la cadena respiratoria o la cadena de transporte de electrones y el enzima *ATP-sintasa*; en los procariotas ambos sistemas se localizan en la membrana citoplasmática y en los eucariotas en la membrana mitocondrial interna. Los equivalentes de reducción procedentes de los sustratos (H o electrones) pasan en la membrana a la cadena respiratoria, y los electrones se transfieren al oxígeno (u otros aceptores terminales de electrones). En la cadena respiratoria se consuma la "reacción bioquímica del gas detonante". Se diferencia energéticamente de la oxidación química del hidrógeno en que una parte considerable de la energía libre pasa al ATP, como energía biológicamente utilizable y sólo se pierde una parte muy pequeña como calor.

Mecanismos de la fosforilación en el transporte de electrones. Los equivalentes de reducción (protones y electrones) cedidos por los sustratos se transportan a la membrana citoplasmática o a la membrana interna de las mitocondrias. Se conducen de tal forma por la membrana, que entre la parte interna y externa de la membrana se establece un gradiente electroquímico, con un potencial positivo fuera y otro negativo en el interior (Fig. 7.8). Esta diferencia de carga se establece debido a la ordenación de los componentes de la cadena respiratoria en la membrana.

Algunos de estos componentes transfieren electrones, otros transfieren hidrógenos. La ordenación de estos transportadores en la membrana determina que en el transporte de electrones del sustrato al oxígeno se capten protones (H^+) en la parte interna de la membrana y se cedan en la externa. Hay que imaginarse que los electrones hacen un camino en zig-zag por la membrana, y así transportan protones del interior al exterior. A este sistema transportador de electrones y protones se le denomina **cadena respiratoria** o **cadena transportadora de electrones**, y desde el punto de vista de su función se habla de una bomba de protones. Ésta es la función principal de este sistema.

El equilibrio de carga en la membrana, esto es, el gradiente electroquímico, es la fuerza motriz para la regeneración del ATP (y de otros procesos que requieren energía). La membrana contiene un enzima especial, la

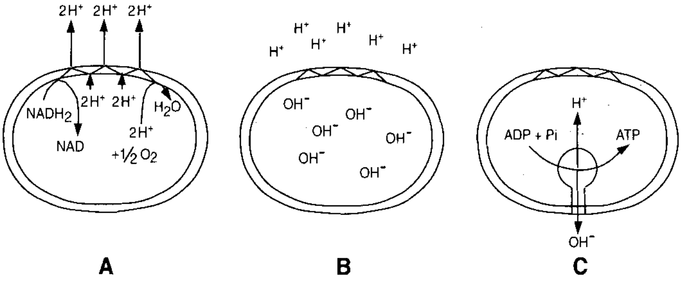


Fig. 7.8 Esquema de la fosforilación en la cadena respiratoria o transporte de electrones en la membrana citoplasmática y adosada a ella en un procariota y en la membrana interna de las mitocondrias. **A** Oxidación del $NADH_2$ y expulsión de protones. **B** Gradiente electroquímico entre las caras interna y externa. **C** Regeneración de ATP como consecuencia del flujo inverso de protones.

ATP-sintasa, que sintetiza ATP a partir de ADP y P_i. Este enzima está localizado igualmente en la membrana y sobresale por la parte interna de la membrana. En la síntesis de ATP fluyen protones del exterior al interior. La síntesis de ATP en el transporte de electrones por la membrana se denomina **fosforilación a nivel de cadena respiratoria** o **de transporte de electrones**.

Para entender la respiración es imprescindible conocer: 1. los componentes de la cadena respiratoria, 2. sus potenciales redox, y 3. su ordenación en la membrana.

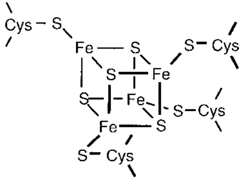
Membranas como lugares de la respiración. Los componentes de la cadena respiratoria son proteínas enzimáticas, que contienen unidos de forma relativamente fuerte grupos de bajo peso molecular (grupos prostéticos). Las primeras conclusiones de que "la respiración es una catálisis por el hierro en superficies" (O. WARBURG), se han confirmado: los enzimas de la cadena respiratoria están fijados a estructuras. En los eucariotas están localizados en la membrana mitocondrial interna. En los procariotas los componentes de la cadena respiratoria están contenidos en la membrana citoplasmática. Desde el punto de vista de la localización y el tipo de los componentes de la cadena respiratoria existe una amplia concordancia entre las membranas citoplasmáticas de las bacterias y las membranas internas de las mitocondrias. La cadena respiratoria de *Alcaligenes eutrophus* y *Paracoccus denitrificans* es prácticamente igual a la de las mitocondrias.

Los componentes de la cadena respiratoria. Los componentes de la cadena respiratoria están incluidos en la doble capa lipídica. Se trata de un gran número de enzimas transportadores de electrones e hidrógeno, de coenzimas y grupos prostéticos, de distintas deshidrogenasas y sistemas transportadores. Las proteínas pueden aislarse de las membranas. Los componentes más importantes implicados en la oxidación del hidrógeno son flavoproteínas, proteínas con hierro y azufre, quinonas y citocromos.

Las **flavoproteínas** son enzimas que tienen FMN o FAD como grupos prostéticos. Transfieren hidrógeno. El grupo activo es el sistema de la isoaloxacina (Fig. 7.9A); actúa como un sistema redox reversible. Los centros reactivos son dos átomos de N; a cada uno de ellos puede unirse un [H^+]. La unión puede realizarse en dos pasos a través de un estado de hemiquinona. Esta capacidad de transferir dos átomos de H o bien uno solo permite que las flavoproteínas intervengan en los dos tipos de procesos de la transferencia de hidrógeno.

Las **proteínas sulfoférricas** son sistemas redox que transportan electrones. Contienen átomos de hierro que están unidos por una parte al azufre del aminoácido cisteína y por otra parte a azufre inorgánico (Fig. 7.9B). Este último puede liberarse fácilmente en forma de sulfuro de hidrógeno por acidificación. Los restos de cisteína son parte de la cadena polipeptídica; los centros Fe-S pueden considerarse como grupos prostéticos del polipéptido. Los centros (2 Fe + 2 S) que participan en la cadena respiratoria sólo pueden transferir un electrón. Las proteínas con Fe-S del tipo (2 Fe + 2 S), cada una de las cuales tiene dos átomos lábiles de azufre y hierro, forman parte de varios complejos enzimáticos de la cadena respiratoria. Un 80% del hierro localizado en la membrana citoplasmática corresponde a proteínas sulfoférricas y sólo el 20% a los citocromos.

Las proteínas con Fe y S además de estar implicadas en el transporte respiratorio de electrones en las membranas participan también en la fijación de N_2, en la reducción del sulfito, en la reducción del nitrito, en la fotosíntesis, en la liberación y activación del hidrógeno molecular y en la oxidación de los alcanos. Las proteínas Fe-S se caracterizan por una masa molecular relativa baja y por potenciales redox fuertemente negativos; E_o' se encuentra entre – 0,2 y – 0,6 V. Además de las proteínas Fe-S con centros (2 Fe + 2 S) (cloroplastos, bacterias aeróbicas) existen otras con un centro (4 Fe + 4 S) (*Clostridium*, *Chromatium*) y otras con dos centros (4 Fe + 4 S) (*Clostridium*, *Azotobacter*). Algunas proteínas Fe-S se denominan según donde se presentan o según la función, como ferredoxina, putidarredoxina, rubredoxina o adrenodoxina.



Otros sistemas redox implicados en la cadena respiratoria son las **quinonas**. En la membrana mitocondrial interna y en las bacterias Gram negativas se encuentra la ubiquinona (= coenzima Q; Fig. 7.9C), en bacterias Gram negativas y Gram positivas las naftoquinonas y en los cloroplastos plastoquinona. Las quinonas, sobre todo la ubiquinona, son lipófilas y por tanto están localizadas en la fase lipídica de la membrana. Pueden transferir hidrógeno o electrones; la transferencia puede desarrollarse en dos pasos, en los que la hemiquinona aparece como fase intermedia. En comparación con los restantes componentes de la cadena respiratoria las quinonas se encuentran unas 10 o 14 veces en exceso. Actúan como un reservorio de los hidrógenos transferidos por distintos coenzimas y grupos prostéticos de la cadena y los ceden a continuación a los citocromos.

Los **citocromos** son sistemas redox que se emplean en el transporte de electrones; no pueden transferir hidrógeno. Reciben los electrones del reservorio de las quinonas; durante esta transferencia se solubiliza un número de protones equivalente al de electrones. Los citocromos contie-

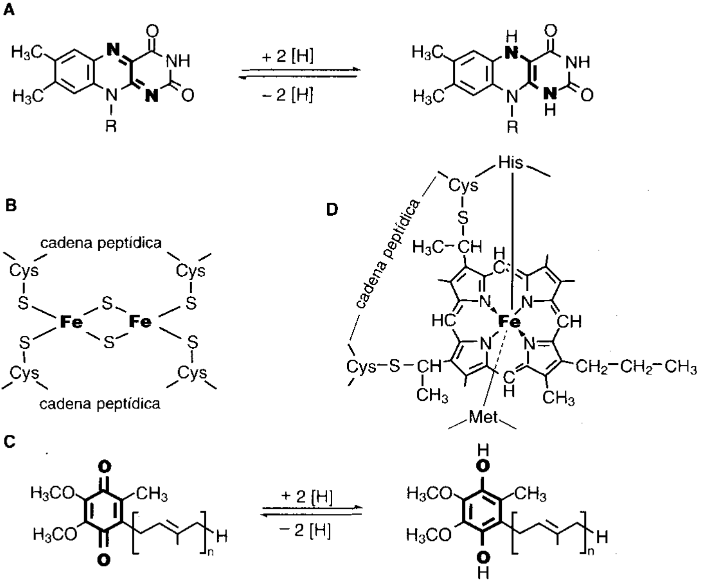


Fig. 7.9 Fórmulas de los principales componentes de la cadena respiratoria. **A** Sistema de anillos isoaloxacina del FMN o FAD en sus formas oxidada y reducida. **B** El centro 2Fe–2S de una proteína sulfoférrica. **C** Reducción de la ubiquinona a ubihidroquinona. **D** El citocromo c.

nen al hemo como grupo prostético (Fig. 7.9D). El átomo central de hierro del anillo hemo participa por cambio de valencia en la transferencia de electrones. Los citocromos son coloreados; se diferencian por sus espectros de absorción y por sus potenciales redox. Se distingue entre citocromos a, a_3, b, c, o y otros muchos. En el citocromo c el grupo hemo está unido covalentemente a los aminoácidos, cisteína, de la apoproteína. Debido a la fuerte unión es hidrosoluble y puede extraerse de la membrana mediante disoluciones salinas. El citocromo c se ha encontrado en casi todos los organismos que disponen de una cadena respiratoria. Desde el punto de vista de la presencia de los otros citocromos existen diferencias considerables.

Los citocromos también participan en la transferencia de electrones al oxígeno. La *citocromo-oxidasa* (= citocromo aa_3) es la oxidasa terminal, que reacciona con el oxígeno y lo carga con 4 electrones:

$$O_2 + 4\,Fe^{2+} \longrightarrow 2\,O^{2-} + 4\,Fe^{3+}$$

El citocromo o, también ampliamente extendido entre las bacterias, puede reaccionar con el oxígeno. Estas oxidasas terminales son inhibidas por el cianuro o el monóxido de carbono.

Durante mucho tiempo se consideró a los citocromos como una característica de los organismos aeróbicos y fototrofos. El descubrimiento del citocromo c_3 en *Desulfovibrio* fue primero sorprendente, pero se comprendió al conocerse que la reducción del sulfato por las bacterias reductoras de sulfatos posibilita una fosforilación en el transporte de electrones bajo condiciones anaeróbicas y que formalmente equivale al proceso respiratorio. Recientemente se ha visto que las bacterias aerotolerantes del ácido láctico *Streptococcus lactis* y *Leuconostoc mesenteroides*, así como el anaeróbico *Bifidobacterium* forman citocromos cuando crecen sobre medios que contienen hemina o sangre. Por último, se han demostrado citocromos también en cepas de *Selenomonas ruminantium*, *Veillonella alcalescens*, *Wolinella succinogenes*, *Clostridium formicoaceticum* y *C. thermoaceticum*. Es plenamente posible que se descubran citocromos en otras bacterias anaeróbicas estrictas, y posiblemente también una modesta fosforilación en una cadena de transporte de electrones.

El potencial redox. El transporte de hidrógeno y de electrones son procesos equivalentes. La cadena respiratoria puede considerarse como una cadena de transporte de electrones. Los componentes de la cadena respiratoria oscilan alternativamente entre sus estados oxidados y reducidos; se comportan como catalizadores redox típicos. Se les puede asignar de una forma directamente medible (citocromos) o indirectamente (NAD, FAD) un potencial redox.

El potencial redox es una medida cuantitativa de la tendencia a ceder electrones por parte de moléculas o elementos. La tendencia a la cesión de electrones se da como medida relativa a la del hidrógeno molecular. Por definición, el hidrógeno, un electrodo de platino rodeado por hidrógeno (p = 1,013 bar) a pH = 0, tiene un potencial 0.

$$H_2 \leftrightharpoons 2\,H^+ + 2\,e^- \qquad (\text{pH } 0;\ p_{H_2} = 1{,}013 \text{ bar})$$

De forma análoga a la serie de tensiones de los elementos también pueden ordenarse las sustancias biológicas en una serie correspondiendo a su potencial redox. El potencial redox para el caso de una semirreducción (cuando la fase oxidada y la reducida están en igual concentración) se designa como E_0. En bioquímica se utilizan los potenciales referidos a pH 7,0, designándolo E_0'. A este pH el electrodo de hidrógeno tiene un potencial E_0' de – 0,42 voltios. La figura 7.10A representa la dependencia del potencial del electrodo de hidrógeno con respecto al pH. De la ecuación de NERNST

$$E = E_0 + \frac{R\,.\,T}{n\,.\,F} \ln \frac{c_1}{c_2}$$

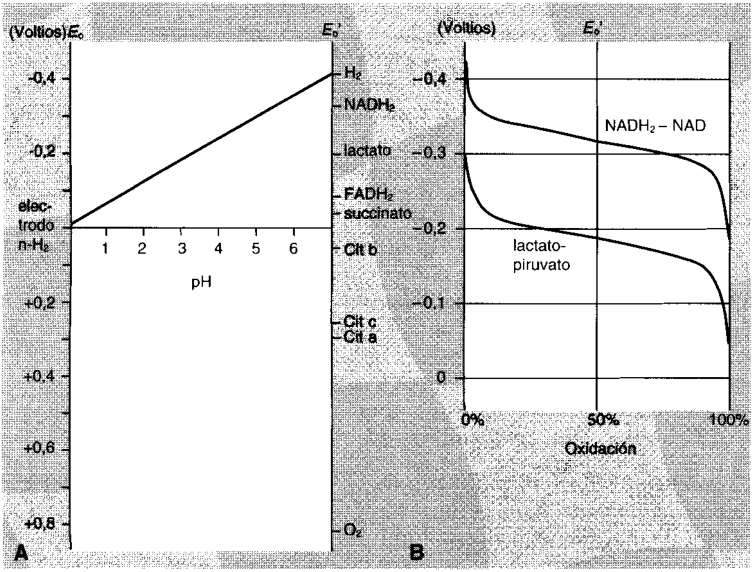


Fig. 7.10 Potenciales redox. A Dependencia respecto del pH del potencial referido al del átomo de hidrógeno (electrodo n-H_2); el potencial normal E_o' se representa para algunos compuestos. **B** Dependencia del potencial real E' de dos sistemas redox con respecto a la concentración de la fase oxidada y reducida.

puede deducirse que el verdadero potencial de un sistema redox E' depende de las concentraciones de las fases oxidadas y reducidas

$$E' = E_0' + \frac{0{,}06}{n} \log \frac{c_{ox}}{c_{red}} \quad \text{(para 30°C)}$$

es tanto más negativo cuanto menor sea la relación de las concentraciones de la sustancia oxidada respecto a la reducida (Fig. 7.10B).

El potencial redox es también una medida del trabajo útil máximo o de la **energía libre** ΔG_o de una reacción. De la diferencia entre los potenciales redox de dos sistemas redox que reaccionan entre sí, ΔE_o, puede calcularse la energía libre de la transformación, ΔG_o, según

$$\Delta G_0 = -n \cdot F \cdot \Delta E_0 = -n \cdot 96{,}5 \cdot \Delta E_0 \text{ (kJ/mol)}$$

Los potenciales normales E_o' de los componentes de la cadena respiratoria van desde – 0,32 V para $NADH_2$/NAD, – 0,08 V para flavoproteína

($FADH_2/FAD$), – 0,04 V para citocromo b (Fe^{2+}/Fe^{3+}) hasta + 0,81 V para $O^{2-}/1/2O_2$. A algunos sustratos también se les puede asignar un potencial normal: lactato/piruvato – 0,186 V; malato/oxalacetato – 0,166 V; succinato/fumarato – 0,03 V.

Para la reacción del gas detonante, considerando la diferencia entre los potenciales normales del H_2 y el O_2 (– 0,42 hasta + 0,81 V = 1,23 V) puede calcularse una energía libre de $\Delta G_o' = - 2 \cdot 96{,}5 \cdot 1{,}23 = - 237{,}4$ kJ/mol. La diferencia de potencial del hidrógeno liberado en la célula al nivel del $NADH_2$ es sólo (+ 0,81 V – [– 0,32 V]) = 1,13 V, equivalente a un $\Delta G_o'$ de – 218 kJ/mol. De forma análoga pueden calcularse los aportes energéticos correspondientes a los transportadores de electrones de la cadena respiratoria, atendiendo a las diferencias de potencial entre ellos (Tab. 7.4).

Tab. 7.4 Potencial redox, diferencias de potencial y equivalentes energéticos de los componentes de la cadena respiratoria.

Componentes de la cadena respiratoria	E_0' (Voltios)	Diferencia (Voltios)	$-\Delta G_0'$ (kJ/mol)	(kcal/mol)
Hidrógeno	–0,42			
		0,10	19,3	4,61
NAD	–0,32			
		0,24	**46,4**	**11,1**
Flavoproteína	–0,08			
		0,04	7,7	1,84
Citocromo b	–0,04			
		0,31	**59,8**	**14,30**
Citocromo c	+0,27			
		0,02	3,8	0,92
Citocromo a	+0,29			
		0,52	**100,4**	**24,0**
Oxígeno	+0,81			

Ordenación y función de los sistemas redox en la cadena respiratoria. Los componentes de la cadena respiratoria pueden ordenarse en una serie con respecto a sus potenciales redox, empezando con el NAD (potencial más negativo) y terminando por la *citocromo-oxidasa* y el oxígeno (Fig. 7.11A). Los electrones son transportados hasta el oxígeno mediante una serie de grandes complejos proteicos –la *NADH-Q-reductasa* (también llamada *NADH-deshidrogenasa*), la *citocromo-reductasa* y la *citocromo-oxidasa*. Estos complejos atraviesan la membrana citoplasmática y fijan fuertemente a los grupos prostéticos –flavinas, citocromos, centros sulfoférricos– y en una posición determinada. Los electrones se transportan desde la *NADH-Q-reductasa* a la *citocromo-reductasa* a través de la forma reducida de la ubiquinona ($UQ \cdot H_2$). Esta proteína, también llamada complejo bc_1, se compone de citocromos del tipo b, un centro sulfoférrico y un citocromo c_1. Toma dos veces un H del $UQ \cdot H_2$ y cede los electrones al cit c. La UQ está en un gran exceso y transporta el hidrógeno en el interior de la bicapa lipídica. El cit c es una proteína de membrana periférica.

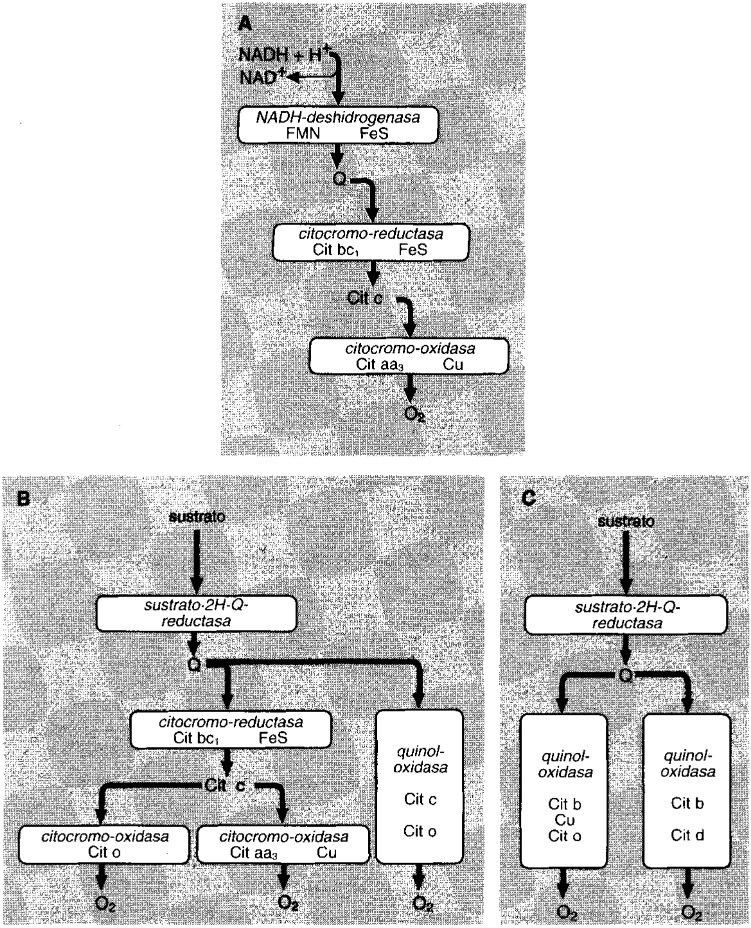

A
NADH + H⁺
NAD⁺
NADH-deshidrogenasa
FMN FeS
Q
citocromo-reductasa
Cit bc₁ FeS
Cit c
citocromo-oxidasa
Cit aa₃ Cu
O₂
B
sustrato
sustrato·2H-Q-reductasa
Q
citocromo-reductasa
Cit bc₁ FeS
Cit c
citocromo-oxidasa
Cit o
citocromo-oxidasa
Cit aa₃ Cu
quinol-oxidasa
Cit c
Cit o
O₂
O₂
O₂
C
sustrato
sustrato·2H-Q-reductasa
Q
quinol-oxidasa
Cit b
Cu
Cit o
quinol-oxidasa
Cit b
Cit d
O₂
O₂

Fig. 7.11 Esquema básico de la cadena respiratoria en las mitocondrias de los eucariotas y en las membranas de muchas bacterias. (**A**) En el transporte de electrones en la cadena respiratoria de las mitocondrias y muchas bacterias participan los tres complejos proteicos con los grupos prostéticos característicos. En muchas bacterias la cadena respiratoria está modificada y ramificada. En *Paracoccus denitrificans* (**B**) los electrones pueden transferirse al oxígeno a través de la *citocromo-reductasa,* cit c y *citocromo-oxidasa,* pero también directamente de la ubiquinona por el cit o como endoxidasa. En *Escherichia coli* (**C**) los electrones se transfieren al oxígeno del cit b al cit o (baja afinidad por el O_2) o al cit d (alta afinidad por el O_2). Con escasez de O_2 se forma predominantemente cit d. Abreviaturas: cit, citocromo; Q, ubiquinona.

La *citocromo-c-oxidasa*, un complejo proteico que contiene cit a, cit a_3 y Cu, lleva los electrones hasta el O_2. Por tanto, en la cadena respiratoria el hidrógeno se ioniza; los protones se liberan de la membrana por acción de los complejos proteicos y los electrones van al O_2.

La secuencia de los sistemas redox inferida a través de los potenciales redox se ha confirmado experimentalmente por investigaciones espectrofotométricas y por análisis con inhibidores.

Este sistema válido para las mitocondrias se encuentra sólo excepcionalmente entre los procariotas aeróbicos. El complejo bc_1 está presente en casi todas las cadenas respiratorias conocidas, pero las bacterias disponen de sistemas ramificados de transporte de electrones y una gran variedad de oxidasas terminales (Fig. 7.11B y C). Se trata de citocromos del tipo b, que se denominan cit o (= *oxidasa*). Están constituidos de forma análoga al complejo del cit aa_3 y actúan igualmente como bomba de protones. Otra oxidasa alternativa es la cit d. La ramificación puede darse a partir del complejo bc_1 o del "pool" de quinonas. Las condiciones ambientales, generalmente la presión parcial de O_2, determinan las ramificaciones de la cadena respiratoria que se forman.

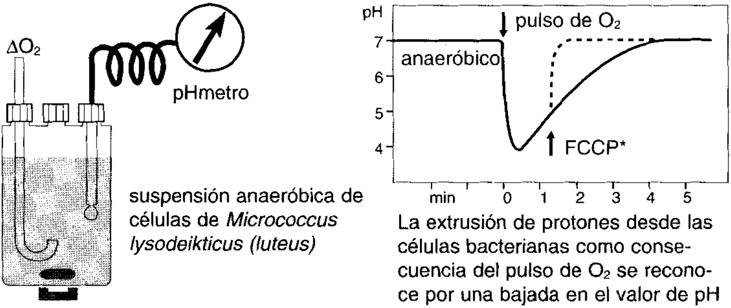
Inhibidores de la cadena respiratoria. La cadena respiratoria se inhibe o bloquea por acción de unos venenos celulares o inhibidores. Amital, rotenona y piericidina A inhiben la *NADH-deshidrogenasa*; la antimicina A bloquea entre el citocromo b y el c. Por último, la *citocromo-oxidasa* se puede inhibir por cianuro y monóxido de carbono; en el citocromo c el ion de hierro está aparentemente tan incluido en la proteína, que no reacciona con el CN^- ni con el CO. La acción específica de estos venenos y las modificaciones de los espectros de absorción característicos de los componentes de la cadena respiratoria son los indicadores con cuya ayuda se ha elucidado la cadena respiratoria.

Cociente P/O y balance energético. La observación de los potenciales redox (Tab. 7.4) indica claramente que en la cadena respiratoria únicamente hay tres oxidaciones en las que por lo menos se libera tanta energía como en un "enlace rico en energía". En la transferencia de 2[H] del $NADH_2$ al oxígeno sólo puede haber tres transferencias de electrones que estén unidas a la fosforilación del ADP a ATP, con lo que como máximo se pueden enlazar orgánicamente tres moléculas de fosfato. Esta relación se expresa normalmente como cociente P/O (mol ATP/mol átomos de oxígeno). Experimentalmente pueden demostrarse en mitocondrias animales cocientes P/O de 3,0 con isocitrato o malato como dadores de hidrógenos, que lo ceden al NAD; para el succinato, que cede el hidrógeno a nivel de las flavoproteínas en la cadena respiratoria, el cociente P/O es tan sólo de 2,0.

El conocimiento de que durante el transporte de dos equivalentes de hidrógeno por la cadena respiratoria se forman tres ATP, permite establecer un **balance energético de la respiración de la glucosa**. Supongamos que 1 mol de glucosa es degradado por la vía de la fructosabifosfato y el ciclo de los ácidos tricarboxílicos, y que todos los hidrógenos se queman a agua a través de la cadena respiratoria: a) vía de la fructosabifosfato: 2 $NADH_2$; b) deshidrogenación del piruvato: 2 $NADH_2$; c) ciclo de los ácidos tricarboxílicos: $2 \cdot 3$ $NADH_2$ y 2 $FADH_2$; en total, por tanto, 10 $NADH_2$ y 2 $FADH_2$. Con un cociente P/O de 3 (o bien 2) pueden obtenerse $10 \cdot 3 + 2 \cdot 2 = 34$ ATP. Sumando los dos ATP ganados en la vía de la fructosabifosfato y los dos trifosfatos de la oxidación del 2-oxoglutarato se obtienen en total **38 ATP**.

Este cálculo es cierto para mitocondrias y muchas bacterias. Un gran número de bacterias disponen, no obstante, sólo de dos puntos de fosforilación, esto es, los hidrógenos proporcionados a través del $NADH_2$ dan cocientes P/O de sólo 2,0. Éste es por ejemplo el caso de las células de *Escherichia coli* en crecimiento aeróbico; la respiración aeróbica de la glucosa conduce sólo a 26 ATP.

Fosforilación en la cadena respiratoria. La regeneración del ATP en la fosforilación de la cadena respiratoria y en la fosforilación fotosintética tiene lugar en membranas. Al igual que los componentes de la cadena respiratoria la *ATP-sintasa* es un componente de la membrana. Aún no está totalmente aclarado cómo los procesos de transferencia de hidrógeno y electrones en la cadena respiratoria están acoplados a la regeneración de ATP. No obstante, se ha demostrado experimentalmente repetidas veces que únicamente se regenera el ATP en vesículas, esto es, espacios totalmente encerrados en membranas. Los procesos de transporte de hidrógeno y electrones están íntimamente unidos a una translocación de protones, que a su vez es la premisa para la regeneración de ATP.


ΔO_2
pHmetro
suspensión anaeróbica de células de *Micrococcus lysodeikticus (luteus)*
pH
7
6
5
4
pulso de O_2
anaeróbico
FCCP*
min
0
1
2
3
4
5

La extrusión de protones desde las células bacterianas como consecuencia del pulso de O_2 se reconoce por una bajada en el valor de pH

* FCCP = carbonil-cianuro-*p*-trifluorometoxi-fenilhidrazona.

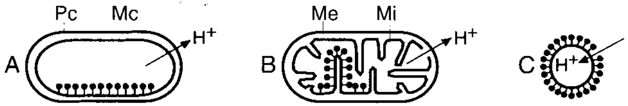


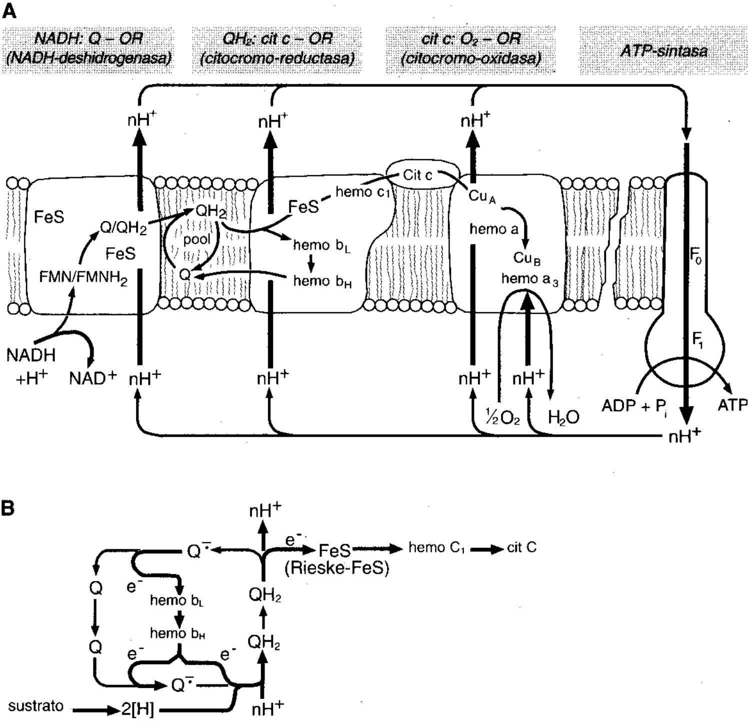
Fig. 7.12 Transporte de protones en la respiración del sustrato. De la célula bacteriana (**A**) o de una mitocondria (**B**) salen protones al medio circundante. En las "partículas submitocondriales" la membrana se orienta de forma inversa ("inside out"), lo que tiene como consecuencia un transporte de protones hacia el interior (**C**). Abreviaturas: Pc = pared celular; Mc = membrana citoplasmática; Me y Mi = membrana mitocondrial externa e interna.

Transporte de protones. Si se le suministra oxígeno a una suspensión de bacterias aeróbicas o mitocondrias, que se había mantenido en condiciones anaeróbicas, se demuestra que en el medio se da un descenso en el valor del pH (esquema pág. 268). De aquí puede concluirse que durante la respiración salen protones de las células bacterianas y de las mitocondrias (Fig. 7.12A, B). Si se obtienen vesículas a partir de bacterias o mitocondrias, en las que la cara interna inicial ha pasado al exterior (vesículas "inside-out") se ve durante la respiración un transporte inverso de protones, que conduce a la alcalinización del medio (Fig. 7.12C). La translocación de protones tiene como consecuencia un gradiente electroquímico. El medio interno de las mitocondrias o bacterias aisladas tiene una carga eléctrica negativa y es alcalino si se compara con el medio donde se suspenden. Ambos gradientes, el del pH y el del potencial eléctrico de membrana, determinan sobre los protones expulsados una atracción en sentido inverso, hacia el interior celular. Este potencial de protones ("proton motive force", ΔP) está compuesto por el potencial eléctrico de membrana ($\Delta\psi$) y la diferencia de pH entre la cara externa y la interna (ΔpH), según

$$\Delta p = \frac{\Delta\tilde{\mu}_{H^+}}{F} = \Delta\psi - Z \cdot \Delta\mathrm{pH}\ [\mathrm{mV}]$$

donde $Z = 2{,}3 \cdot R \cdot T/F$, esto es, 59 mV a 25°C. El potencial de protones puede ser debido exclusivamente a la diferencia de pH, exclusivamente al potencial de membrana, o a ambos conjuntamente.

Los resultados experimentales están de acuerdo con la siguiente suposición: la membrana citoplasmática de las bacterias y la membrana interna de las mitocondrias son impermeables a los iones, incluido el H^+ y el OH^-; la conductividad de las membranas es baja. La membrana tiene una constitución asimétrica, a pesar de que la doble capa lipídica parezca simétrica; la topografía de las proteínas funcionales (componentes del transporte de electrones, *ATP-sintasa*, permeasas entre otras) da a la membrana un carácter asimétrico. La orientación espacial de las moléculas enzimáticas

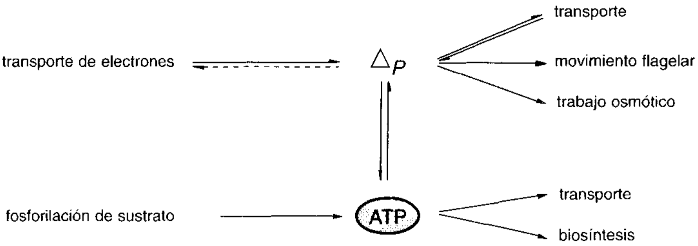

A
NADH: Q – OR (NADH-deshidrogenasa)
QH₂: cit c – OR (citocromo-reductasa)
cit c: O₂ – OR (citocromo-oxidasa)
ATP-sintasa
nH⁺
FeS
Q/QH₂
FeS
FMN/FMNH₂
NADH +H⁺
NAD⁺
QH₂
pool
Q
FeS
hemo c₁
hemo b_L
hemo b_H
Cit c
Cu_A
hemo a
Cu_B
hemo a₃
½O₂
H₂O
F₀
F₁
ADP + Pᵢ
ATP
B
nH⁺
Q⁻
e⁻
FeS
(Rieske-FeS)
hemo C₁
cit C
Q
hemo b_L
hemo b_H
QH₂
sustrato
2[H]

7.13 Representación esquemática de la ordenación de los grandes complejos proteicos de la cadena respiratoria en la membrana interna de las mitocondrias y de la membrana citoplasmática de las bacterias. Se han resaltado en rojo los flujos de electrones del NADH a través de la *NADH:Q-oxidorreductasa*, *quinol:cit c-oxidorreductasa* y *cit c:*O_2*-oxidorreductasa* (= *citocromo-oxidasa*) hasta el O_2. La translocación de protones hacia el exterior (extrusión) se simboliza por flechas negras gruesas. A la derecha se indica la *ATP-sintasa* con sus componentes, los complejos F_0 y F_1. No se consideran las relaciones estequiométricas entre los protones transportados y los electrones (**A**). La función central del pool Q/QH_2 en conjunción con el complejo *quinol:cit c-oxidorreductasa* se ha ampliado en **B**. En esta serie de reacciones, denominadas “Ciclo Q” se transfiere un electrón de la ubiquinona (QH_2) a través del centro sulfoférrico (de “Rieske”) y el hemo c_1 hasta el citocromo c. La ubisemiquinona que queda (Q^-) se oxida a ubiquinona (Q) por transferencia de electrones a través del hemo b_L (bajo potencial). El hemo b_L transfiere el electrón al hemo b_H (alto potencial), que alternativamente puede reducir a Q o a Q^-. Abreviaturas: cit c, citocromo c; OR, oxidorreductasa; Q, ubiquinona.

tiene como consecuencia un metabolismo vectorial. Según una propuesta de MITCHELL se acepta que la cadena respiratoria está compuesta por una sucesión alternante de transportadores de hidrógeno y de electrones (véase Fig. 7.13D). La oxidación del sustrato tiene como consecuencia un consumo de protones en la cara interna de la membrana y una cesión de protones en la cara externa. Si aceptamos tres lazos, en la oxidación del $NADH_2$ se transportarán seis protones hacia afuera. Este transporte de protones impulsado por la respiración conduce a un gradiente electroquímico entre las caras externa e interna de la membrana. El potencial de protones es la fuerza que conduce por último a la fosforilación, esto es a la regeneración del ATP. La transformación de energía bioquímica por regeneración de ATP es por tanto una consecuencia del potencial de protones; conlleva un equilibrio en el potencial de membrana. Éste es el contenido de la **"teoría quimiosmótica"**.

Regeneración de ATP a partir de ADP y P_i. La síntesis de ATP a partir de ADP y P_i está catalizada por la *ATP-sintasa*. El enzima transforma la energía liberada en el flujo de electrones en el enlace fosfoéster del ATP rico en energía. El enzima se ha encontrado en todas las membranas implicadas en la transformación energética, es decir, en las membranas de las mitocondrias, los cloroplastos y las bacterias. Es bastante grande (masa molecular rel. $350 \cdot 10^3$) y de constitución compleja (Fig. 7.13A). Está formado por una cabeza, compuesta por varias subunidades y un pedúnculo en la base; este último se incluye en la capa lipídica media de la membrana citoplasmática. La función de la *ATP-sintasa* consiste en liberar una molécula de agua del ADP y el fosfato, formándose ATP. Aún no se sabe cómo el flujo de protones o el potencial de protones determina este paso de fosforilación; posiblemente los protones fluyan a través de un canal o un poro de la molécula enzimática hacia el interior de las mitocondrias o las bacterias, y la energía entonces liberada determina la fosforilación.

La *ATP-sintasa* es idéntica a la *ATPasa* F_1. Este enzima se puede demostrar en la hidrólisis del ATP: $ATP + H_2O \longrightarrow ADP + P_i + H^+$. La reversibilidad de la reacción de la *ATP-sintasa* es de una extraordinaria importancia para la célula. Si hay ATP disponible, por ejemplo por fosforilación de sustrato, puede establecerse un potencial de protones con ayuda de la *ATP-sintasa*. El enzima puede asumir, por tanto, la función de una "bomba de protones" o de una "bomba electrogénica". La reversibilidad de los procesos que discurren en la membrana citoplasmática tiene como consecuencia que el potencial de protones y el ATP sean interconvertibles. Esta interconvertibilidad es de importancia esencial en los procesos asociados (de transporte, movimiento flagelar, biosintéticos) y se indica en el siguiente esquema.



Transporte inverso de electrones. Las bacterias que utilizan un dador de hidrógeno cuyo potencial redox sea más positivo que el de los nucleótidos de piridina plantean problemas especiales. Los piridín nucleótidos reducidos se necesitan en los procesos de síntesis, sobre todo en la reducción del 3-fosfoglicerato en el curso de la fijación autótrofa de CO_2. Como consecuencia, los nucleótidos de piridina han de reducirse también cuando el sulfuro, el tiosulfato, el azufre, el nitrito o el Fe^{2+} actúan como dadores de hidrógeno. Como por motivos termodinámicos no es posible una reducción directa del NAD por estos dadores de hidrógeno, en estos casos se da un transporte inverso de electrones impulsado por ATP, y que la regeneración del ATP sólo tiene lugar en la fracción terminal de la cadena respiratoria próxima al oxígeno. El transporte de electrones inverso con la consiguiente reducción del NAD, dependiente del ATP, se ha demostrado ya en *Nitrobacter*, *Thiobacillus* y en *Comamonas carboxydovorans*.

Efecto tóxico del oxígeno sobre aerobios y anaerobios. El oxígeno es el aceptor terminal de electrones de la respiración aeróbica y por ello esencial para todos los organismos aeróbicos. Se sabe bien desde los tiempos de PASTEUR en las investigaciones sobre la formación de ácido butírico por bacterias, que el oxígeno es tóxico para las bacterias anaeróbicas estrictas. Sorprende no obstante, que el oxígeno tenga también una acción tóxica sobre los organismos aeróbicos, y que la mayoría de los organismos dispongan de enzimas que desarrollan un efecto protector contra los productos tóxicos del oxígeno.

En el campo biológico hay que diferenciar tres tipos de activación del oxígeno, que se caracterizan por el número de electrones que se transfieren simultáneamente a la molécula de oxígeno:

(1) $O_2 + 4e^- \longrightarrow O^{2-} + O^{2-}$
(2) $O_2 + 2e^- \longrightarrow O_2^{2-}$
(3) $O_2 + 1e^- \longrightarrow O_2^-$

La reacción (1) está catalizada por la *citocromo-oxidasa*, el enzima terminal de la cadena de transporte de electrones. Se transfieren simultáneamente cuatro electrones, formándose dos iones O^{2-}, cada uno de los cuales forma agua con dos protones. La *citocromo-oxidasa* y algunos enzimas azules que contienen cobre (por ejemplo, tirosinasa, lacasa) son los únicos enzimas que efectúan una transferencia tetravalente de electrones al O_2.

La reacción (2) es característica de algunos enzimas que contienen flavinas (*glucosa-oxidasa*, aminoácido-oxidasas, *xantín-oxidasa*). Estos enzimas transfieren simultáneamente dos electrones y reducen el O_2 al ion peróxido O_2^{2-} que con protones pasa a peróxido de hidrógeno, H_2O_2. El H_2O_2 es tóxico para la célula, oxida por ejemplo a los grupos SH. La *catalasa* y la *peroxidasa* tienen una acción protectora.

$$2\ H_2O_2 \xrightarrow{\textit{catalasa}} 2\ H_2O + O_2$$

$$H_2O_2 + 2\ GSH \xrightarrow{\textit{glutatión-peroxidasa}} GSSG + 2\ H_2O$$

Como los enzimas flavínicos se encuentran en muchas bacterias anaeróbicas y aeróbicas, es comprensible que todos los organismos aeróbicos dispongan de *catalasa.*

La reacción (3) está catalizada por un gran número de oxidasas (*xantín-oxidasa, aldehído-oxidasa, NADPH-oxidasa,* entre otros). Únicamente se transfiere un electrón, con lo que se forma el ion superóxido O_2^- que, como radical, es muy reactivo. Se trata tan sólo de una reacción colateral de los enzimas mencionados; el radical superóxido y el producto consecuencia de la transformación del O_2 con el H_2O_2 ($O_2^- + H_2O_2 + H^+ \longrightarrow O_2 + H_2O + OH^-$), el radical hidroxilo, son muy reactivos y en la célula conducen a compuestos muy reactivos. El efecto protector frente a los radicales superóxido lo desarrolla la *superóxido-dismutasa.*

$$2\ O_2^- + 2\ H^+ \xrightarrow{\textit{superóxido-dismutasa}} H_2O_2 + O_2$$

Conjuntamente con la *catalasa*, la *superóxido-dismutasa* transforma a los radicales superóxido en oxígeno inocuo (en su estado básico).

Se acepta que únicamente pueden tolerar el oxígeno aquellos organismos que dispongan de *superóxido-dismutasa.* El enzima se ha encontrado en (prácticamente) todas las bacterias aerotolerantes investigadas hasta ahora. No obstante, aún no pueden hacerse generalizaciones porque la investigación sigue realizándose todavía.

Procesos de transporte de electrones en bacterias anaeróbicas. En condiciones anaeróbicas, esto es, en ausencia de oxígeno, los organismos quimioorganotrofos pueden obtener energía bioquímica (ATP) de dos modos: por fermentación o por fosforilación en el transporte de electrones en condiciones anaeróbicas. Los organismos fermentativos disponen de pocas reacciones para la regeneración del ATP, que se describen como fosforilaciones a nivel de sustrato (pág. 250 y 292).

Sin embargo, también en condiciones anaeróbicas muchas bacterias realizan una fosforilación en el transporte de electrones, transfiriendo los electrones que aparecen en la degradación del sustrato a través de cadenas de transporte de electrones (acortadas) hasta aceptores externos (del medio de cultivo) o internos (formados durante la degradación del sustrato). Como aceptores de electrones pueden actuar iones nitrato, sulfato, carbonato y fumarato, así como el azufre, y a las bacterias se las reúne en los grupos fisiológicos respectivos de los reductores de nitratos y desnitrificantes, los desulfuricantes, los metanogénicos, las bacterias acetogénicas y por último las reductoras del azufre. Estas bacterias tienen un papel importante en la economía de la naturaleza. Como durante mucho tiempo se consideró la fosforilación en el transporte de electrones como un proceso de transformación energética típicamente respiratorio, se habla también de una "respiración anaeróbica" (pág. 337 y sig.) para la transformación energética por fosforilación en el transporte de electrones en condiciones anaeróbicas.

La fosforilación en el transporte de electrones con fumarato como aceptor de electrones se extiende más allá de las bacterias, y se encuentra también en los gusanos e incluso en los mamíferos. La función de la reacción catalizada por la *fumarato-reductasa* se reconoce por la acumulación o excreción de succinato.

7.5 Ciclos auxiliares y gluconeogénesis

Durante el crecimiento celular se toman constantemente productos intermediarios del ciclo de los ácidos tricarboxílicos para la biosíntesis y estas pérdidas hay que equilibrarlas mediante unas reacciones de reposición (**reacciones anapleróticas**). Su función es sobre todo la de formar oxalacetato como aceptor del acetil-coenzima A.

Durante el crecimiento con glucosa como sustrato este azúcar puede servir para la síntesis de todos los compuestos que contienen glucosa, ribosa, desoxirribosa y otros derivados de los azúcares. En estos casos las reacciones anapleróticas se utilizan en primer lugar para suministrar al ciclo de los ácidos tricarboxílicos. Durante el crecimiento sobre lactato, piruvato, acetato, glioxilato y otros compuestos de carbono hacen falta otras vías adicionales, no sólo para que no se pare el ciclo de los ácidos tricarboxílicos, sino también para la biosíntesis de los compuestos azucarados (gluconeogénesis).

Glucosa como sustrato. Las reacciones anapleróticas que suministran al ciclo de los ácidos tricarboxílicos más importantes y extendidas entre animales, plantas y microorganismos son carboxilaciones de ácidos C_3 (piruvato, fosfoenolpiruvato) a oxalacetato (Fig. 7.14). En los tejidos animales (hígado y riñón) así como en algunos pseudomonas se da una carboxilación del piruvato por la *piruvato-carboxilasa*:

$$\text{piruvato} + CO_2 + \text{ATP} \longrightarrow \text{oxalacetato} + \text{ADP} + P_i$$

La más extendida es aparentemente una carboxilación del fosfoenolpiruvato por la *fosfoenolpiruvato-carboxilasa*:

$$\text{fosfoenolpiruvato} + CO_2 + H_2O \longrightarrow \text{oxalacetato} + P_i$$

Esta reacción es casi irreversible.

Lactato, piruvato y otras moléculas C_3 como sustrato. El crecimiento de las células sobre piruvato u otras moléculas relacionadas no sólo hace necesario el rellenado del ciclo de los ácidos tricarboxílicos, sino también la síntesis de glucosa y sus derivados. La síntesis de azúcares **(gluconeogénesis)** a partir de lactato se realiza a través de los mismos compuestos intermediarios que participan en la glucolisis (vía de la fructosabifosfato). Sin embargo, los pasos catalizados por la *hexoquinasa*, la *6-fosfofructoquinasa* y la *piruvato-quinasa* en la vía degradativa son rodeados por reacciones enzimáticas exergónicas en el sentido de la síntesis de glucosa (Fig. 7.3). En los tejidos animales (hígado, riñón) la reacción prácticamente irreversible de la *piruvato-quinasa* se soslaya mediante la carboxilación del piruvato al oxalacetato (*piruvato-carboxilasa*) y una reacción inmediata catalizada por la *fosfoenolpiruvato-carboxiquinasa*:

$$\text{oxalacetato} + \text{GTP} \longrightarrow \text{fosfoenolpiruvato} + CO_2 + \text{GDP}$$

Esta síntesis que conduce del piruvato al fosfoenolpiruvato a través del oxalacetato requiere dos enlaces fosfato ricos en energía, uno para la carboxilación del piruvato y otro para la síntesis del fosfoenolpiruvato a partir del oxalacetato.

Recientemente se ha visto que la reacción inversa catalizada por la *fosfoenolpiruvato-carboxiquinasa* es la única reacción en la que puede sintetizarse oxalacetato a partir de moléculas C_3 en numerosas bacterias anaeróbicas estrictas (y helmintos). En un medio con una concentración elevada de anhídrido carbónico la reacción se ve favorecida en el sentido del oxalacetato.

En *Escherichia coli* y otras bacterias el piruvato se fosforila directamente mediante la *fosfoenolpiruvato-sintetasa* (Fig. 7.14):

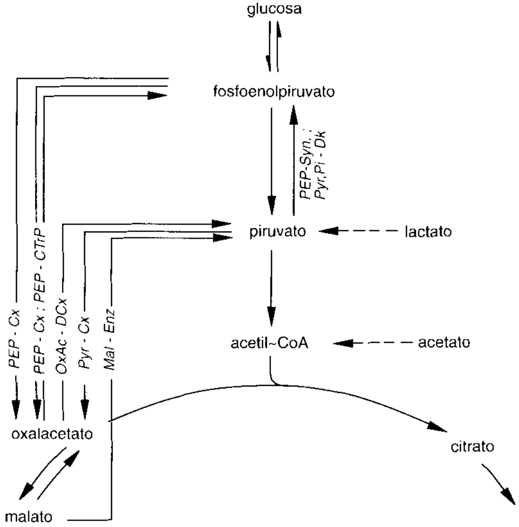


Fig. 7.14 Vías de reacción más importantes que relacionan a los compuestos de C_3 piruvato y fosfoenolpiruvato con el oxalacetato o el malato. Enzimas implicados: Mal-Enz = *enzima málica*; OxAc-DCx = *oxalacetato-descarboxilasa*; PEP-Ck = *fosfoenolpiruvato-carboxiquinasa*; PEP-Cx = *fosfoenolpiruvato-carboxilasa*; PEP-Syn = *fosfoenolpiruvato-sintetasa*; PEP-CTrP = *fosfoenolpiruvato-carboxitransfosforilasa*; Pyr-Cx = *piruvato-carboxilasa*; Pyr, P_i-Dk = *piruvato, ortofosfato-diquinasa.*

$$\text{piruvato} + \text{ATP} + H_2O \longrightarrow \text{fosfoenolpiruvato} + \text{AMP} + P_i$$

Aquí se requieren igualmente dos enlaces fosfato ricos en energía. La síntesis de oxalacetato se realiza a través de la *fosfoenolpiruvato-carboxilasa. E. coli* no dispone de la *piruvato-carboxilasa.*

Las propionibacterias, *Acetobacter aceti, Entamoeba histolytica* y *Fusobacterium symbiosus* disponen de otro enzima, que forma piruvato a partir del fosfoenolpiruvato, la *piruvato-ortofosfato-diquinasa.* Cataliza la reacción reversible

$$\text{piruvato} + \text{ATP} + P_i \leftrightharpoons \text{fosfoenolpiruvato} + \text{AMP} + PP_i$$

Resulta notable que en esta reacción se conserva el enlace difosfato rico en energía. En las plantas C_4 (del ácido dicarbónico) (maíz, caña de azúcar) el enzima es igualmente responsable de la síntesis del fosfoenolpiruvato, que a continuación se transforma a oxalacetato por la *fosfoenolpiruvato-carboxilasa.*

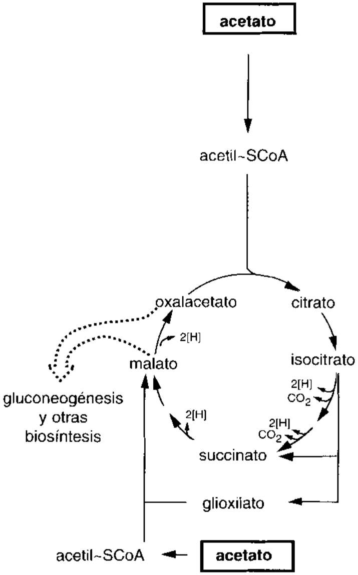

acetato
acetil~SCoA
oxalacetato
citrato
2[H]
malato
isocitrato
2[H]
CO2
gluconeogénesis
y otras
biosíntesis
2[H]
2[H]
CO2
succinato
glioxilato
acetil~SCoA
acetato

Fig. 7.15 Vías metabólicas que suministran a la célula energía y compuestos carbonados elementales durante su crecimiento sobre acetato. La vía de degradación (ciclo de los ácidos tricarboxílicos) se indica con flechas negras y las rojas señalan la vía anaplerótica (vía del ácido glioxílico) (según H.L. KORNBERG).

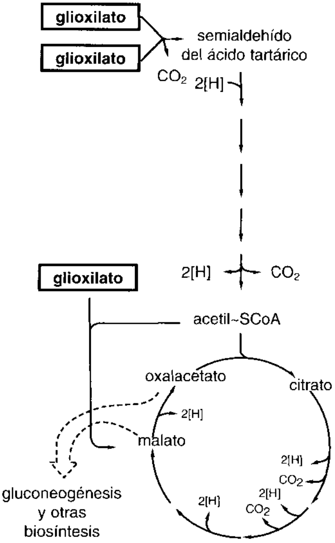
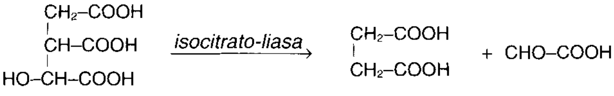

glioxilato
glioxilato
semialdehído
del ácido tartárico
CO2
2[H]
glioxilato
2[H]
CO2
acetil~SCoA
oxalacetato
citrato
2[H]
malato
2[H]
CO2
gluconeogénesis
y otras
biosíntesis
2[H]
2[H]
CO2

Fig. 7.16 Vías metabólicas que suministran a la célula energía y compuestos carbonados elementales durante su crecimiento sobre ácido glioxílico. La vía de degradación (ciclo de los ácidos dicarboxílicos) está indicada con flechas negras y las rojas señalan la vía anaplerótica (vía del glicerato) (según H.L. KORNBERG).

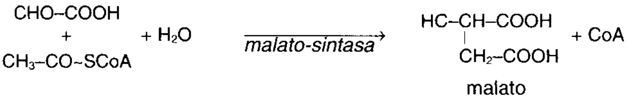
Acetato como sustrato. El crecimiento sobre acetato o compuestos que se degraden pasando por acetato (ácidos grasos, hidratos de carbono) es posible en los microorganismos gracias al ciclo del **ácido glioxílico** (KREBS-KORNBERG) (Fig. 7.15). Esta secuencia anaplerótica se basa en la función de dos enzimas. La *isocitrato-liasa* rompe al isocitrato en succinato y glioxilato:



$$\begin{array}{l} CH_2\text{–}COOH \\ | \\ CH\text{–}COOH \\ | \\ HO\text{–}CH\text{–}COOH \end{array} \xrightarrow{\textit{isocitrato-liasa}} \begin{array}{l} CH_2\text{–}COOH \\ | \\ CH_2\text{–}COOH \end{array} + CHO\text{–}COOH$$

isocitrato succinato glioxilato

Al glioxilato se le añade acetil-coenzima A por acción de la *malato-sintasa*, formándose malato:

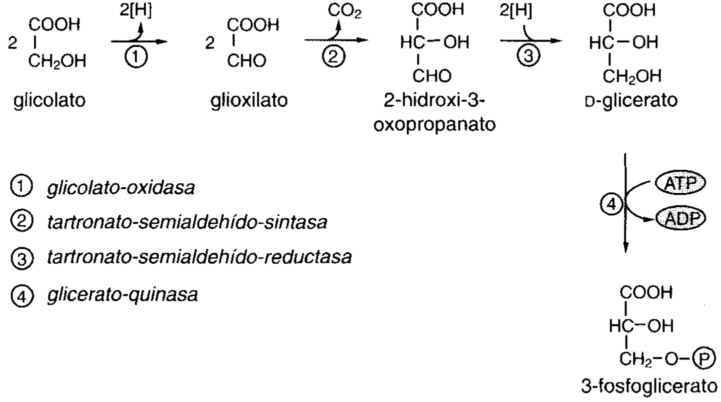


$$\begin{array}{c}CHO{-}COOH\\ +\\ CH_3{-}CO{\sim}SCoA\end{array} + H_2O \xrightarrow{\textit{malato-sintasa}} \begin{array}{c}HC{-}CH{-}COOH\\ |\\ CH_2{-}COOH\end{array} + CoA$$

Por la acción conjunta de la *isocitrato-liasa* y la *malato-sintasa* se transforman de esta manera un mol de isocitrato y un mol de acetil-CoA en dos moles de ácido dicarbónico (C_4). Por una parte, estos últimos pueden transformarse en piruvato, por la *enzima málica*, o en fosfoenolpiruvato, por la *fosfoenolpiruvato-carboxiquinasa*, y desviarse así hacia la gluconeogénesis.

Por otra parte, proporcionan oxalacetato para la reacción de la *citrato-sintasa*, y con ello sillares para la biosíntesis. El ciclo del ácido glioxílico parece imprescindible para los suministros del ciclo de los ácidos tricarboxílicos cuando se transforma glucosa, piruvato u otros compuestos carbonados.

Glioxilato como sustrato. Cuando como fuente de C actúa el glioxilato o alguno de sus precursores (glicolato, urea) se inducen los enzimas de la **vía del D-glicerato**. Mediante la *tartronato-semialdehído-sintasa* (también llamada *glioxilato-carboligasa*) se transforman dos moléculas de glioxilato en el semialdehído del ácido tartrónico (2-hidroxi-3-oxopropanato) con liberación de anhídrido carbónico. Este aldehído se reduce mediante una reductasa específica a glicerato y este último se fosforila a 3-fosfoglicerato.



① *glicolato-oxidasa*

② *tartronato-semialdehído-sintasa*

③ *tartronato-semialdehído-reductasa*

④ *glicerato-quinasa*

El acetil-CoA formado por la vía ordinaria entra en el ciclo de los ácidos tricarboxílicos (véase Fig. 17.16 en la página 277). El enzima *malato-sintasa* se encarga del suministro de productos intermediarios; cataliza la reacción de transformación de otra molécula de glioxilato con acetil-CoA hasta malato.

Los enzimas del metabolismo básico están siempre presentes cuando las células crecen sobre glucosa como sustrato, mientras que los enzimas implicados en los ciclos accesorios son inducibles. Durante el crecimiento con glucosa el contenido en estos enzimas es muy bajo y a veces casi no se pueden demostrar. Se habla de un nivel basal de actividad enzimática. Tan sólo cuando se trasladan las células a un medio que contenga acetato o glioxilato como única fuente de energía y carbono se induce la formación de los enzimas antes indicados.

El contenido en enzimas de las células totalmente inducidas puede ser cien veces el nivel basal o aún más. La determinación de las actividades de los enzimas antes indicados, antes y después del cambio de sustrato permite comprobar si se ha dado una inducción enzimática por el sustrato. Si se ha formado el enzima puede estarse seguro que está implicado en la transformación del nuevo sustrato. La confirmación absoluta se tiene no obstante, cuando se trabaja con compuestos marcados radioactivamente demostrando los átomos marcados en los productos intermedios y finales del metabolismo.

No debe tenerse la impresión de que todos los enzimas implicados en la transformación de los azúcares forman siempre parte del conjunto de enzimas de la célula, esto es, que sean constitutivos. Si las células bacterianas crecen por ejemplo sobre acetato, únicamente se formarán aquellos enzimas del metabolismo de la glucosa que estén implicados también en la gluconeogénesis; los enzimas que participan exclusivamente en la degradación de la glucosa sólo se encuentran en muy pequeñas cantidades, o no son demostrables, en células crecidas sobre acetato.

Si a las células se les proporciona simultáneamente dos sustratos, frecuentemente sólo se utiliza uno de ellos. Durante el crecimiento de *Escherichia coli* o de algunos pseudomonas en un medio con glucosa y acetato se utiliza primero la glucosa. No se forman los enzimas necesarios para la utilización del acetato mientras haya glucosa disponible. Se habla entonces de una **represión por catabolito** de los enzimas necesarios para la utilización del acetato. Más detalles acerca de la regulación de la síntesis enzimática se tratarán en el capítulo 16 (Regulación del metabolismo, pág. 549).

7.6 Biosíntesis de algunos compuestos de bajo peso molecular

Biosíntesis de los aminoácidos. La mayoría de los microorganismos y las plantas verdes son capaces de sintetizar *de novo* los 20 aminoácidos necesarios para la síntesis proteica. Los esqueletos carbonados de los aminoácidos proceden de los metabolitos de las vías del metabolismo intermediario. Los grupos amino se introducen por una aminación directa o por transaminación. La transferencia de nitrógeno inorgánico a un enlace orgánico tiene siempre lugar a través del amonio. El nitrato, nitrito y nitrógeno molecular se reducen primero en la asimilación a amonio y entonces pasan al compuesto orgánico (Fig. 7.17, números 1, 2 y 3).

Pocos aminoácidos pueden resultar de una **aminación directa** con iones amonio libres. En la asimilación primaria de amonio participan la *L-glutamato-deshidrogenasa* (6) y la *L-alanina-deshidrogenasa* (7); reducen y aminan a los 2-oxoácidos; aquí no interviene el ATP. La formación de glutamina a partir de glutamato está catalizada por la *glutamina-sintetasa* (4). Este enzima tiene una afinidad por los iones amonio muy superior (valor de K_m menor) que las deshidrogenasas indicadas, y por eso es activo aun cuando las concentraciones de NH_4^+ sean extremamente bajas; para la formación de glutamina se requiere ATP. El grupo amida de la glutamina puede transferirse al 2-oxoglutarato mediante la *glutamato-sintasa* (5). Este sistema de introducción de nitrógeno amoniacal en moléculas orgánicas lo sintetizan y utilizan aparentemente las bacterias y las plantas siempre que la concentración de iones amonio que tienen a su disposición sea baja (inferior a 1 mmol/l), sobre todo también durante la fijación de N_2.

La mayoría de los aminoácidos restantes obtienen sus grupos amino por **transaminación** a partir de los aminoácidos primarios. Entre los aminoácidos libres que se encuentran en el citoplasma el glutamato es el que está en mayor concentración (más de la mitad del "pool" de aminoácidos).

Se han investigado bien las vías seguidas por los microorganismos para sintetizar los 20 aminoácidos. La síntesis se inicia a partir de compuestos sencillos del metabolismo intermediario (piruvato, 2-oxoglutarato, oxalacetato o fumarato, eritrosa-4-fosfato, ribosa-5-fosfato y ATP). En la mayoría de los aminoácidos el grupo amino se introduce por transaminación en el último paso de la síntesis. Algunos aminoácidos proceden de varias transformaciones a partir de otros aminoácidos y no requieren una transaminación. Los aminoácidos pueden ordenarse en grupos atendiendo a sus vías biosintéticas comunes, tal como se refleja en la figura 7.18. La síntesis de los aminoácidos implica distinto número de pasos enzimáticos; resulta notable que para el hombre sean esenciales aquellos

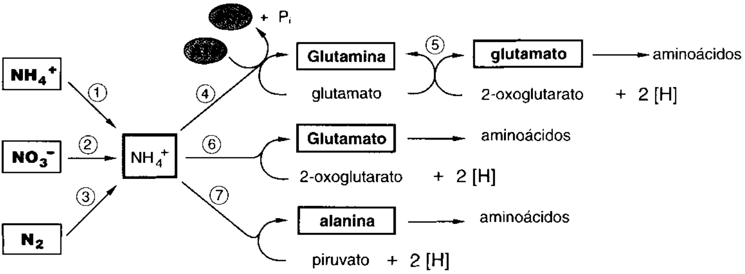


Fig. 7.17 Principales vías de asimilación de nitrógeno. Los iones amonio que se encuentran en el medio de cultivo son captados directamente por la célula (1). Los iones nitrato se reducen a amonio a través de la vía de la nitratoreducción asimilatoria (2) y el nitrógeno molecular (dinitrógeno) por la fijación de nitrógeno (3). En un compuesto orgánico el nitrógeno amoniacal se transfiere con participación del ATP a través de la glutamina, o sin gasto de ATP por amonificación reductiva del 2-oxoglutarato o del piruvato.

aminoácidos que sólo pueden obtenerse a través de un camino especialmente largo.

El **esclarecimiento** relativamente rápido de las **vías biosintéticas**, éstas y otras, se debe a la utilización de mutantes auxótrofos de hongos y especialmente de bacterias. La auxotrofía de muchos mutantes se debe a la pérdida de la capacidad para formar un enzima biosintético; para crecer necesitan por tanto el producto final de la vía sintética bloqueada por el defecto enzimático. Estos mutantes tienen además otra característica favorable: no crecen únicamente con el producto final de la vía bloqueada, sino también con los productos intermedios entre el enzima defectuoso (el "bloqueo") y el producto final. Por otra parte, el sustrato del enzima bloqueado se excreta con frecuencia, esto es, cuando el enzima defectuoso es b, se excreta el producto intermedio B.

$$\mathrm{A} \xrightarrow{\text{enzima a}} \mathrm{B} \xrightarrow{\text{enzima b}} \mathrm{C} \xrightarrow{\text{enzima c}} \mathrm{D} \xrightarrow{\text{enzima d}} \text{producto final}$$

Por ello, algunos mutantes pueden alimentar a otros mutantes que estén bloqueados en distintos productos de la misma vía biosintética, de modo que un mutante con un bloqueo posterior (fallo en el enzima d) suministra a otro mutante con un bloqueo anterior (fallo en el enzima b) con el intermediario que le falta. Mediante pruebas de nutrición cruzada (**sintrofismo**) pueden ordenarse los mutantes en una serie, de modo que cada una nutra a la siguiente. Mediante el aislamiento de los productos intermedios excretados, purificación de los enzimas biosintéticos, y tam-

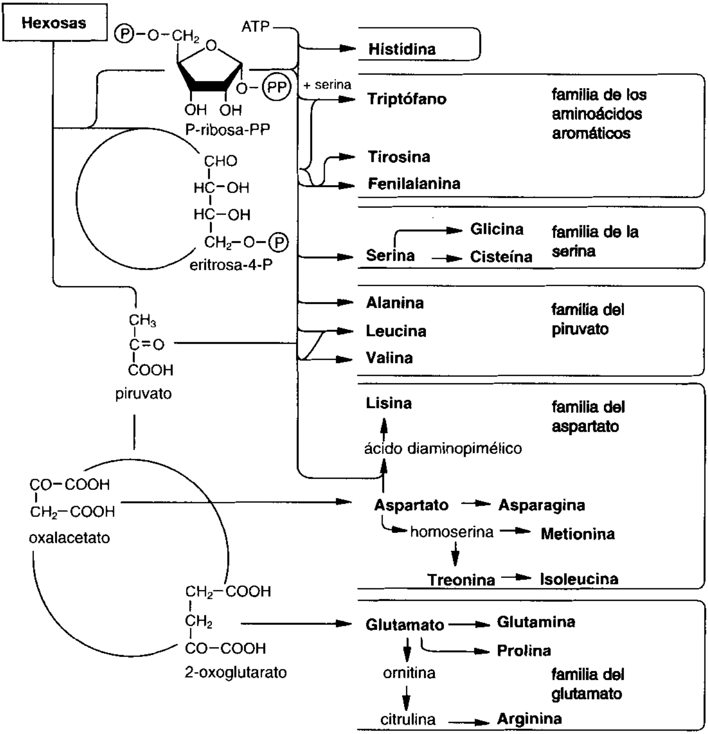

Hexosas
ATP
P-ribosa-PP
+ serina
eritrosa-4-P
piruvato
oxalacetato
2-oxoglutarato
Histidina
Triptófano
Tirosina
Fenilalanina
familia de los aminoácidos aromáticos
Glicina
Serina
Cisteína
familia de la serina
Alanina
Leucina
Valina
familia del piruvato
Lisina
ácido diaminopimélico
Aspartato
Asparagina
homoserina
Metionina
Treonina
Isoleucina
familia del aspartato
Glutamato
Glutamina
Prolina
ornitina
citrulina
Arginina
familia del glutamato

Fig. 7.18 Síntesis de los veinte aminoácidos necesarios para la síntesis proteica a partir de compuestos sencillos del metabolismo intermediario.

bién con ayuda de otros métodos, pudieron esclarecerse ya muchas vías biosintéticas.

Biosíntesis de nucleótidos. Los nucleótidos púricos y pirimidínicos son los componentes de los ácidos nucleicos; forman parte además de varios coenzimas y se utilizan para activar y transportar aminoácidos, azúcares, componentes de la pared celular y lípidos. La síntesis de los nucleótidos púricos tiene una vía común, que no se bifurca hasta el nivel de los ácidos adenílico y guanílico. Los nucleótidos de piridina se sintetizan también a través de una sola vía, que se bifurca a partir del ácido uridílico.

La pentosa componente de los nucleótidos procede de la ribosa-5-fosfato. Ésta puede formarse de dos modos distintos: de forma oxidativa a partir de la glucosa-6-fosfato a través de la vía oxidativa de la pentosafosfato, y de forma no oxidativa a partir de la fructosa-6-fosfato y el gliceraldehído-3-fosfato mediante las reacciones de la *transaldolasa-transcetolasa* (pág. 252). La ribosa-5-fosfato se utiliza para la síntesis de los nucleótidos púricos y pirimidínicos en su forma energéticamente rica, como fosforribosildifosfato. La reducción de la ribosa a desoxirribosa se realiza a nivel del ribonucleótido y transcurre según diversos mecanismos de reacción.

Biosíntesis de las grasas. Las grasas o lípidos son por una parte componentes esenciales de las membranas citoplasmáticas y paredes celulares, y por otra sirven como material de reserva. En las grasas bacterianas predominan los ácidos grasos (de C_{14} a C_{18}) saturados y con un enlace no saturado; parece que no hay ácidos grasos con más enlaces no saturados, ni esteroides, y los triglicéridos también son raros. De gran importancia son los lípidos complejos; están compuestos por glicerina, que tiene dos grupos hidroxilo esterificados por ácidos grasos; el tercer grupo hidroxilo está esterificado por fosfato o un azúcar. El residuo fosfato, a su vez, está unido a serina, etanolamina o glicerina. Entre estos lípidos demostrados ya en muchas bacterias se encuentran fosfatidilinositol, fosfatidilglicerina y fosfatidiletanolamina.

La biosíntesis de los ácidos grasos de cadena larga consiste en una adición y reducción de grupos acetato. Para incrementar la capacidad reactiva del grupo metilo del acetil-CoA se carboxila previamente en una reacción que es biotina-dependiente:

$$CH_3{-}CO{\sim}SCoA + CO_2 + ATP + H_2O \longrightarrow HOOC{-}CH_2{-}CO{\sim}SCoA + ADP + P_i$$

formándose malonil-CoA. Un grupo carboxilo se libera en forma de anhídrido carbónico en el curso de las reacciones de condensación subsiguientes. La síntesis de los ácidos grasos se realiza en un complejo multienzimático y sigue la siguiente ecuación:

$$CH_3{-}CO{\sim}CoA + 7\ \text{malonil-CoA} + 14\ NADPH_2 \longrightarrow \text{palmitil-CoA} + 14\ NADP + 7\ CO_2 + 7\ CoA + 7\ H_2O$$

7.7 Asimilación de sustancias por la célula

Antes de que un nutriente pueda ser transformado en la célula tiene que atravesar las cubiertas celulares. La pared celular no ofrece ninguna resistencia significativa a las moléculas pequeñas y a los iones, pero retiene a las macromoléculas con una masa molecular superior a 600. La capa celular responsable del transporte de nutrientes al interior celular es la membrana citoplasmática.

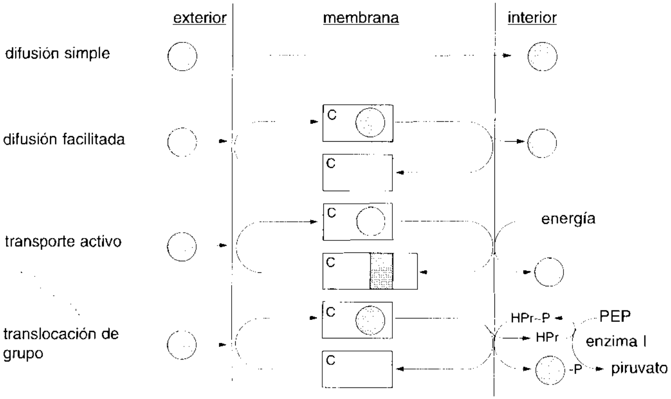


Fig. 7.19 Representación esquemática de los cuatro mecanismos del transporte de sustancias al interior de la célula. Símbolos: círculo rojo = sustrato que debe transportarse; C = (carrier) proteína *permeasa*; C con zona gris = carrier energetizado; PEP = fosfoenolpiruvato; HPr = proteína estable al calor; véase texto.

Los mecanismos de **transporte de nutrientes a través de la membrana citoplasmática** son por lo general específicos; únicamente pueden captarse aquellos sustratos para los que se dispone del sistema de transporte correspondiente (Fig. 2.21 y 7.19). El transporte va ligado a la presencia de permeasas o translocasas específicas. Se trata de proteínas de membrana y la denominación indica ya que las proteínas tienen un carácter enzimático, esto es, pueden estar condicionadas a la inducción por el sustrato, son específicas del mismo y sólo se forman en condiciones en que sea posible la síntesis proteica.

El concepto de transporte tiene en biología celular varios significados distintos. Si consideramos únicamente los procesos de transporte en la membrana citoplasmática o a su través, pueden diferenciarse inicialmente dos tipos de transporte, el primario y el secundario. Entre el **transporte primario** se cuentan aquellos procesos que conducen al desplazamiento de iones como el H^+ y el K^+, y que conducen así a una modificación del potencial electroquímico. La fuerza motriz de los procesos de transporte son los transportes electrónicos respiratorio o fotosintético, o bien bombas iónicas impulsadas por el ATP (*ATPasas*), o por descarboxilación de metabolitos (oxalacetato, metilmalonil-CoA, glutaconil-CoA).

Como **transportes secundarios de membrana** se reúnen a todos los procesos de transporte cuya fuerza motriz son los potenciales electroquímicos, que conducen a la entrada de metabolitos o iones al interior de la célula (influjo) o a su salida (eflujo). Los procesos tratados aquí bajo el apartado 7.7 condicionados al potencial electroquímico hay que incluirlos en el transporte secundario.

Desde el punto de vista del mecanismo de transporte se diferencian varios procesos, de los que tan sólo dos permiten el transporte, pero no acumulación en la célula; frente a ellos, se encuentran varios procesos de transporte activo que conducen a la acumulación de sustancias en la célula (Fig. 7.19 y 7.20).

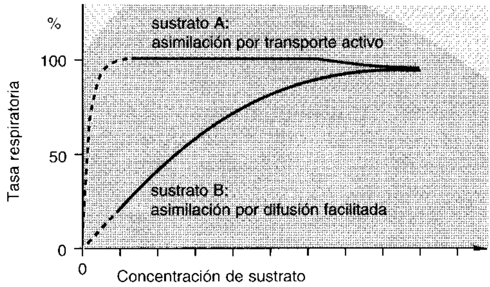


Fig. 7.20 Curvas de saturación de sustrato en la captación de dos sustratos por células bacterianas intactas, medidas por las tasas de consumo de O_2 (tasa respiratoria). La asimilación activa y pasiva de sustrato puede reconocerse por el curso de la curva. Como el sustrato A es captado por transporte activo y se acumula en la célula, la respiración alcanza la tasa máxima ya con concentraciones de sustrato muy bajas. El sustrato B se asimila pasivamente, por lo que la tasa respiratoria alcanza su nivel máximo sólo con concentraciones de sustrato relativamente altas (aprox. 10-20 mmol/l).

Difusion pasiva. La penetración inespecífica de sustancias al interior de la célula se denomina difusión simple o pasiva. Para la difusión son determinantes el tamaño de la molécula y sus características lipófilas. Las velocidades de transporte son pequeñas. Estos procesos no han podido demostrarse para los azúcares y son poco probables. Por difusión pasiva se asimilan probablemente venenos no polares, inhibidores y otras sustancias extrañas a la célula.

Difusión facilitada. En el curso de la difusión facilitada el nutriente del medio de cultivo penetra en la célula según su gradiente de concentración. El proceso es posible gracias a una permeasa específica del sustrato. Es independiente de la energía metabólica necesaria; la velocidad de transporte depende en un amplio margen de la concentración de sustrato en el medio (Fig. 7.20). El nutriente no puede almacenarse en la célula en contra de un gradiente de concentración.

Transporte activo. El transporte activo y la translocación de grupo tienen en común con la difusión facilitada la participación de proteínas de transporte específicas del sustrato. Se diferencian no obstante de la difusión facilitada en que el transporte requiere un gasto energético.

Si hay energía metabólica disponible la sustancia puede almacenarse en la célula en contra de un gradiente de concentración. La diferencia básica entre el transporte activo y la translocación de grupo radica en la naturaleza del producto que se cede al interior de la célula.

En el transporte activo se libera en el citoplasma la misma molécula que se ha tomado del medio de cultivo. Durante la translocación de grupo se modifica la molécula en el transporte, por ejemplo, se fosforila.

Los modelos ideados para explicar el **transporte activo** tienen en común que en la membrana hay proteínas de transporte específicas, cuyo nombre indica la función: permeasas, translocasas, proteínas translocadoras o "carrier". Los procesos de transporte se diferencian principalmente por la forma en que se suministra la energía para el transporte, por un potencial de protones Δp (véase Fig. 7.21) o bien por ATP o fosfoenolpiruvato (Fig. 7.19 y 7.21).

Para el transporte de muchas sustancias, entre ellas iones orgánicos e inorgánicos, así como azúcares, la energía procede del **potencial de protones** Δp (véase pág. 269 y sig.). Las células bacterianas mantienen el potencial de protones bombeando continuamente protones y otros iones (Na^+) hacia el exterior de la célula. En la membrana se localizan proteínas específicas de transporte.

Cada una de estas proteínas tiene una función muy determinada. Existe, por ejemplo, una proteína, que cataliza el paso simultáneo y en la misma dirección de un protón y una molécula de azúcar (lactosa, melibiosa, glucosa). Se habla en este caso de un **simporte** de dos (o más) sustancias. Otras proteínas de transporte catalizan el paso simultáneo de dos sustancias, pero en sentido inverso, por ejemplo, un protón y otro ion (Na^+ o un ácido orgánico); aquí se habla de **antiporte**. Los iones que movilizan a los azúcares son probablemente siempre iones H^+ o Na^+. En los procariotas predomina el simporte acoplado al H^+ y en los eucariotas al Na^+.

Se ha podido demostrar por diversos métodos que, efectivamente, en las células bacterianas se encuentran estas proteínas de transporte: (a) por aislamiento e inclusión de las proteínas transportadoras reguladoras purificadas en protoplastos, o en los llamados liposomas y (b) por aislamiento de mutantes defectivos que carecen de las proteínas correspondientes y de su función específica. El transporte realizado por el poten-

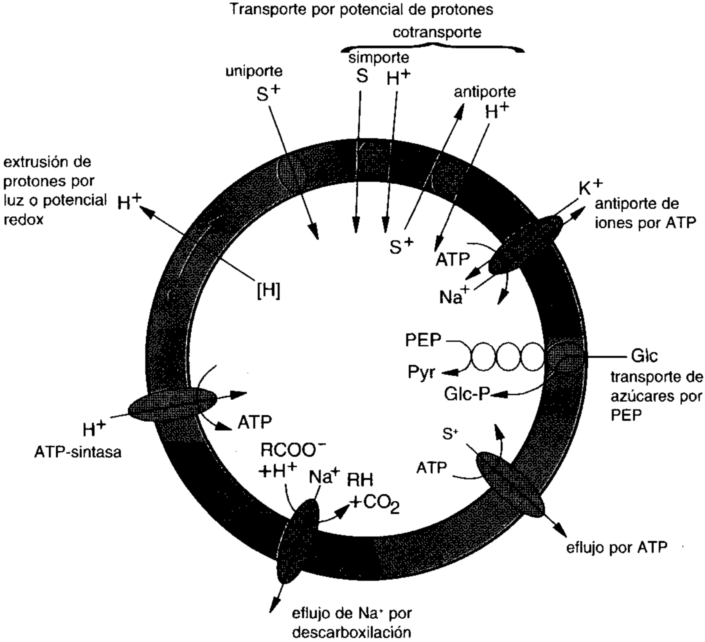

Transporte por potencial de protones
cotransporte
uniporte
S^+
simporte
S H^+
antiporte
H^+
extrusión de protones por luz o potencial redox
H^+
[H]
S^+
ATP
Na^+
K^+
antiporte de iones por ATP
PEP
Pyr
Glc-P
Glc
transporte de azúcares por PEP
H^+
ATP-sintasa
ATP
$RCOO^-$
$+H^+$
Na^+
RH
$+CO_2$
S^+
ATP
eflujo por ATP
eflujo de Na^+ por descarboxilación

Fig. 7.21 Representación conjunta de los sistemas para el transporte de iones y otros metabolitos a través de la membrana citoplasmática.

cial de protones representa probablemente el mecanismo más habitual de captación activa de sustratos.

La suposición de la participación de proteínas carrier específicas en el transporte de iones se confirma por la acción de algunos antibióticos y sustancias sintéticas. Se trata de **ionóforos**; son compuestos de una masa molecular relativa baja (500-2000), cuya cara externa es hidrofóbica y la interna hidrófila. Debido a la hidrofobicidad difunden en la membrana lipídica. El antibiótico con función de ionóforo más conocido es la valinomicina; difunde en la membrana y cataliza el transporte (uniporte) de K^+, Cs^+, Rb^+ o NH_4^+. En presencia de estos cationes en el medio, conduce a un equilibrio en la carga (en cierto modo un cortocircuito) y a una caída del potencial de membrana. Otros ionóforos forman canales a través de los que pueden pasar los iones. También existen compuestos sintéticos que incrementan la conductibilidad de protones de la membrana; el transportador de protones más conocido es el FCCP (carbonil-cianuro-*p*-trifluorometoxi-fenilhidrazona); actúa como "desacoplante" de la síntesis de ATP con respecto al transporte de electrones, porque se transportan protones al interior celular sin intervención de la *ATP-sintasa*. La investigación del transporte de membrana ha aportado conocimientos esenciales que concuerdan y confirman la teoría quimiosomótica de la transformación de la energía.

Junto a los sistemas de transporte dependientes del potencial de protones se dan también otros dependientes del ATP. Aquí también tienen un papel proteínas de unión periplásmicas (Fig. 2.29). La membrana citoplasmática de las células animales no transporta protones y no establece ningún gradiente de protones. El potencial de membrana se establece probablemente tan sólo por mecanismos de bombeo dependientes del ATP, como por ejemplo, la bomba de sodio y potasio, y el potencial de Na^+ conduce al simporte del nutriente Na^+.

Translocación de grupo. En la translocación de grupo la molécula se modifica químicamente durante el transporte; por ejemplo, se capta un azúcar como tal y se libera en el interior como azúcar fosforilado. Fructosa, glucosa, manitol y otros hidratos de carbono son asimilados por el sistema de la *fosfotransferasa*, dependiente del fosfoenolpiruvato (PTS). En la translocación de grupo están implicadas cuatro proteínas (Fig. 7.22). El enzima II es una proteína integrante de la membrana, forma un canal y cataliza la fosforilación del azúcar. El grupo fosfato no se transfiere directamente del PEP, sino que en primer lugar un enzima I lo lleva a una proteína pequeña termorresistente (HPr). Su forma fosforilada, HPr~P reacciona con el enzima III, una proteína de membrana periférica, y la proteína II del canal transfiere el grupo fosfato al azúcar. Los enzimas II y III son específicos para cada azúcar, mientras que el enzima I y el HPr están implicados en el transporte de todos los azúcares que se translocan por el sistema PTS. En el transporte de algunos azúcares no está implicado el enzima III. La complejidad del PTS indica que el sistema no sólo es útil para el transporte, sino que también tiene funciones reguladoras. Por

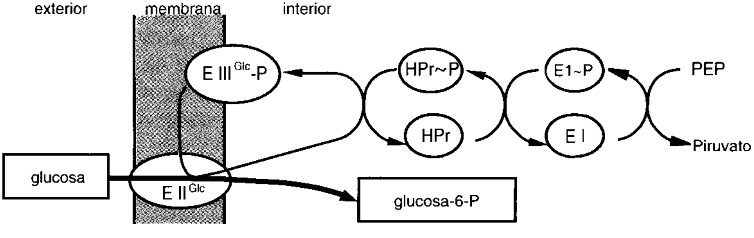


Fig. 7.22 Transporte de glucosa por el sistema fosfoenolpiruvato: glucosa fosfotransferasa (PTS). EI, EII y EIII = enzima I, enzima II y enzima III, HPr = proteína estable al calor. Para aclaraciones, véase texto.

ejemplo, los azúcares captados por el sistema PTS inhiben el transporte y la utilización de otros azúcares que estén presentes simultáneamente (véase apartado 16.1.3, Represión por catabolito).

Salida de sustancias. Acerca de la secreción de metabolitos al medio se conoce mucho menos que de los mecanismos de asimilación. En la salida de sustancias parecen también estar implicados tanto sistemas de transporte como de difusión no controlada. La excreción de sustancias tiene lugar cuando por una superproducción se acumulan en la célula en concentraciones anormales. La acumulación puede deberse a una oxidación incompleta, a un fallo en la regulación o a la fermentación.

Transporte del hierro. Los microorganismos disponen de mecanismos especiales para el transporte al interior de la célula del hierro, que es un macroelemento. En condiciones anaeróbicas se presenta como iones de hierro II (ferrosos); su concentración puede ser como máximo 10^{-1} mol/l, y no limita por tanto el crecimiento. En un medio aeróbico a pH 7,0 el hierro se encuentra no obstante como complejo de hidróxido férrico (III). Éste es prácticamente insoluble; la concentración en iones de hierro III es tan sólo de 10^{-18} mol/l. No es por ello sorprendente que los microorganismos excreten sustancias que solubilicen el hierro, que fijan los complejos de iones de Fe^{3+} y así los transportan. A estas sustancias se las denomina **sideróforos**; se trata casi sin excepción de sustancias hidrosolubles de bajo peso molecular (< 1500) que fijan al hierro por coordinación con una elevada especificidad y afinidad (constante de estabilidad aprox. 10^{30}). Con respecto a la naturaleza de los ligandos del hierro se diferencia entre fenolatos e hidroxamatos. A los primeros pertenece la enterobactina; tiene seis grupos hidroxilo fenólicos y es excretada por algunas enterobacterias. La forma sin hierro, enterobactina, llega al medio, fija al hierro y la ferri-enterobactina es asimilada. Por hidrólisis enzimática de la enterobactina cargada con el hierro en la célula queda el hierro libre (Fig. 7.23). Los pigmentos fluorescentes amarillo verdosos segregados por *Pseudomonas putida* y *P. aeruginosa* tienen también función de sideróforos (pág. 87).

Muchos hongos producen ferricromos con el mismo fin; se trata de sideróforos del grupo del hidroxamato. Son hexapéptidos cíclicos, que fijan al hierro férrico a través de tres grupos hidroxamato. Se excretan igualmente como compuestos sin hierro, lo fijan en el medio y lo vuelven a asimilar en forma de ferricromo. En la célula se reduce a Fe^{2+}, para el que el ferricromo tiene poca afinidad y así se libera. Función semejante cumplen la ferrioxamina (en actinomicetos), la micobactina (en micobacterias) y la exoquelina (también en micobacterias).

Los sideróforos se excretan al medio por los microorganismos en general cuando el hierro limita el crecimiento. La excreción es consecuencia de una desrepresión de la síntesis del sideróforo. En presencia de hierro liga-

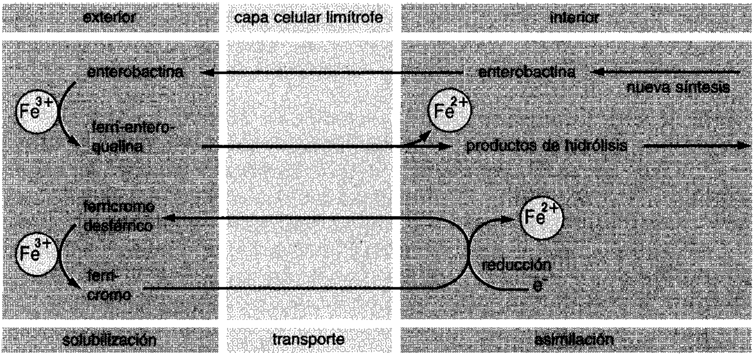

exterior
capa celular limítrofe
interior
enterobactina
enterobactina
nueva síntesis
Fe^{3+}
Fe^{2+}
ferri-entero-quelina
productos de hidrólisis
ferricromo desférrico
Fe^{2+}
Fe^{3+}
reducción
e^-
ferri-cromo
solubilización
transporte
asimilación

Fig. 7.23 Ejemplos de mecanismos de transporte del hierro en células de microorganismos con sideróforos. Arriba se representa el sistema de muchas bacterias con la enteroquelina; abajo el sistema del ferricromo de muchos hongos.

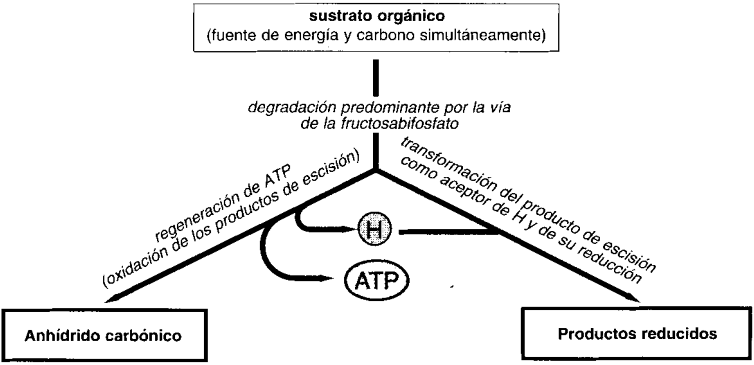
do en complejos, soluble, se sintetizan los sideróforos sólo en pequeñas cantidades y se retienen en la pared celular. Entonces sirven únicamente para el transporte del hierro al interior de la célula.

En relación con esto resulta interesante que el mantenimiento del medio sin hierro es uno de los mecanismos de defensa de los organismos superiores. En ellos se encuentran proteínas fijadoras del hierro que lo fijan tan fuertemente que ya no está disponible para los microorganismos y no permite su crecimiento, por ejemplo en la clara de huevo (conalbumina), en la leche, en las lágrimas y en la saliva (lactotransferrina), lo mismo que en el suero sanguíneo (serotransferrina). En la clara de huevo no pueden crecer bacterias inoculadas si simultáneamente al inóculo no se inyectan iones de hierro (en forma de citrato férrico amónico). En otras palabras: el hierro tiene un papel importante en las interrelaciones entre los organismos superiores y las bacterias. La batalla la gana aquel que produzca un quelante del hierro con mayor poder de fijación.

8. Fermentaciones especiales

Se encuentran microorganismos fermentadores en todos aquellos lugares de la naturaleza donde haya compuestos orgánicos y el oxígeno no esté presente. Las bacterias capaces de fermentar se encargan en la **economía de la naturaleza** de las degradaciones iniciales de los biopolímeros que han sido transportados a lugares a los que el oxígeno no tiene ningún acceso. Las bacterias fermentadoras se instauran rápidamente en los hábitats sin oxígeno (es decir, anóxicos), siempre que las demás condiciones lo permitan. La **celulosa** es el polímero más abundante de los sedimentos de lagos y lagunas, así como en biodigestores, y es degradada por fermentación. Una gran parte de la celulosa consumida en la alimentación por los animales herbívoros se libera de nuevo sin digerir. Si este detritus que contiene celulosa llega a zonas anóxicas, es digerido por clostridios anaeróbicos estrictos. Los productos de fermentación resultantes, entre ellos alcoholes, ácidos orgánicos, anhídrido carbónico e hidrógeno quedan a disposición de otras bacterias, quienes, a través de fermentaciones especiales y respiración anaeróbica, producen finalmente metano y, en presencia de sulfato, sulfhídrico. Las fermentaciones inician así la llamada "cadena alimentaria anaeróbica".

En los sedimentos de los lagos de agua dulce y en la panza de los rumiantes el hidrógeno y el acetato se transforman en metano por bacterias metanogénicas, y en los ecosistemas marinos anóxicos el hidrógeno y el sulfato se convierten en sulfhídrico por bacterias sulfurógenas (respiradores de sulfato).

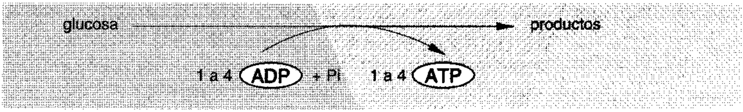

sustrato orgánico
(fuente de energía y carbono simultáneamente)
degradación predominante por la vía de la fructosabifosfato
regeneración de ATP (oxidación de los productos de escisión)
transformación del producto de escisión como aceptor de H y de su reducción
H
ATP
Anhídrido carbónico
Productos reducidos

En la **transformación** y **conservación** de alimentos se utilizan los productos de fermentación de los microorganismos desde hace milenios. A modo de representación, citemos la fabricación de la cerveza, vino, ácido láctico y leches ácidas, col fermentada o el ensilado, el queso y la levadura de panadería. Muchos fermentadores son bacterias anaeróbicas estrictas. Otras son anaeróbicas facultativas, que pueden crecer tanto en presencia como en ausencia de oxígeno. El oxígeno no participa en los procesos fermentativos, y la definición de L. PASTEUR "la fermentation est la vie sans l'air" se mantiene válida en la investigación básica. El término **fermentación** ha adquirido una significación más amplia en la Microbiología industrial (también llamada hoy día Biotecnología microbiana). Como los recipientes con agitación en los que tienen lugar las transformaciones aeróbicas son los mismos en los que se realizan las fermentaciones anaeróbicas clásicas, se habla de fermentación cuando se trata de cualquier proceso microbiano para la obtención de productos (metabolitos o biomasa), y a los recipientes se les denomina fermentadores de forma equívoca.

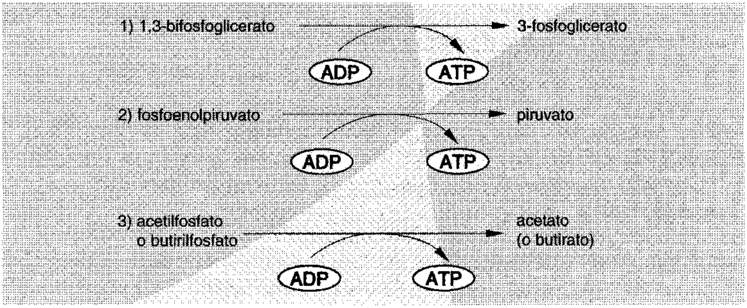
Fermentación. Tal como ya se ha señalado anteriormente, la premisa básica para el metabolismo celular es la obtención de energía metabólica. De las tres posibilidades para regenerar el ATP, respiración, fermentación y fotosíntesis, la fermentación es la más sencilla de todas. La fermentación es un proceso metabólico regenerador de ATP en el que los productos en que se divide el sustrato orgánico sirven a la vez de dadores de hidrógenos y de aceptores de hidrógenos. Las transformaciones que conducen a la fosforilación del ADP son reacciones de oxidación. La célula se libera del carbono oxidado en forma de anhídrido carbónico. Los pasos de oxidación son deshidrogenaciones; el hidrógeno es transferido al NAD. Como aceptores del hidrógeno presente en forma de $NADPH_2$ actúan productos intermediarios de la degradación del sustrato. En la regeneración del NAD éstos se reducen, y los productos de reducción obtenidos son excretados por la célula.

En la fermentación de los hidratos de carbono y de otros sustratos aparecen –bien aisladamente o mezclados– los siguientes productos: etanol, lactato, propionato, formiato, butirato, succinato, capronato, acetato, *n*-butanol, 2,3-butanodiol, acetona, 2-propanol, anhídrido carbónico e hidrógeno molecular. Según el producto de excreción prioritario en cantidad, o más característico, se diferencia entre fermentación alcohólica, láctica, propiónica, acética, butírica y fórmica.

Regeneración de ATP por fermentación. En la fermentación de la glucosa por los microorganismos, tal como se indica en el esquema siguiente, se regeneran de 1 a 4 moles de ATP:


glucosa
productos
1 a 4 ADP + Pi
1 a 4 ATP

Teniendo en cuenta el gran número de posibles productos de fermentación, resulta sorprendente que en la transformación de energía en el curso de la fosforilación a nivel de sustrato únicamente participen unas pocas reacciones; entre ellas presentamos a las tres más importantes.


1) 1,3-bifosfoglicerato
3-fosfoglicerato
ADP
ATP
2) fosfoenolpiruvato
piruvato
ADP
ATP
3) acetilfosfato o butirilfosfato
acetato (o butirato)
ADP
ATP

La mayoría de los fermentadores únicamente utilizan las transformaciones catalizadas por la *fosfoglicerato-quinasa* (1) y la *piruvato-quinasa* (2) y forman los aceptores de hidrógeno necesarios a partir de piruvato y acetilcoenzima A. En la fermentación de 1 mol de glucosa sólo se regeneran 2 (hasta 3) moles de ATP, y como productos aparecen lactato, etanol, acetona, butirato, butanol, 2-propanol, 2,3-butanodiol, caproato, acetato, anhídrido carbónico e hidrógeno.

La incorporación de la *acetato-quinasa*, véase reacción (3), da a las bacterias la ventaja de regenerar más ATP. El acetilfosfato se forma por transformación del acetil-CoA con P_i y ayuda de la *fosfotransacetilasa*:

$$\text{acetil-CoA} + P_i \longrightarrow \text{acetilfosfato} + \text{CoA}$$

Además el acetilfosfato se puede formar gracias a la *fosfocetolasa* a partir de fosfoazúcares (xilulosa-5-fosfato, fructosa-6-fosfato). El que una bacteria pueda utilizar la reacción de la *acetato-quinasa* depende de las posibilidades de que disponga para liberar hidrógeno molecular (H_2). Para equivalentes de reducción (electrones) que (transportados a protones y) puedan ser liberados como hidrógeno molecular, la célula fermentadora no necesita sintetizar ningún aceptor de hidrógenos. Para comprender las relaciones debemos profundizar en los mecanismos de liberación de H_2.

Las bacterias anaeróbicas oxidan el piruvato a acetil-CoA por dos vías (véase oxidación del piruvato, reacción (2) y (3), pág. 254). En la reacción catalizada por la *piruvato-ferredoxina-oxidorreductasa* (tipo clostridial) se reduce la ferredoxina. Su potencial redox es tan bajo (E_0' = – 420 mV) que a través de una hidrogenasa especial, *ferredoxina* H_2*-oxidorreductasa* se puede liberar hidrógeno gaseoso:

$$2\ \mathrm{FdH} \xrightarrow{\textit{hidrogenasa}} 2\ \mathrm{Fd} + \mathrm{H_2}$$

En la reacción catalizada por la *piruvato formiato-liasa* (tipo Enterobacteriácea) se forma formiato además de acetil-CoA. Éste puede romperse mediante un sistema *hidrógeno-liasa*:

$$\mathrm{formiato} \longrightarrow \mathrm{H_2} + \mathrm{CO_2}$$

Ambos mecanismos para liberar H_2 tienen en común que los pasos precedentes (FdH y formiato) tienen un potencial redox muy bajo. Por ello, la célula puede liberarse sin dificultades de los equivalentes de reducción procedentes de la oxidación del piruvato a acetil-CoA.

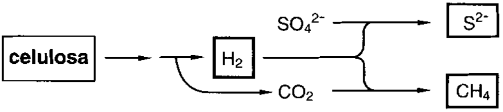
Por el contrario, el hidrógeno en forma de $NADH_2$ liberado en la deshidrogenación del gliceraldehído-3-fosfato es transferido en la mayoría de las bacterias anaeróbicas a aceptores orgánicos de hidrógeno. No obstante, muchas bacterias disponen de la posibilidad de liberar también estos equivalentes de reducción en forma de H_2. Para ello disponen de un enzima que interactúa entre el $NADH_2$ y la ferredoxina. Este enzima, $NADH_2$*-ferredoxina-oxidorreductasa*, cataliza la reacción:

$$\mathrm{NADH_2} + 2\ \mathrm{Fd} \longrightarrow \mathrm{NAD} + 2\ \mathrm{FdH}$$

Del FdH puede liberarse H_2 mediante una *hidrogenasa.* Como sea que estas reacciones van ligadas a un incremento en el potencial del hidrógeno (de E_o' = – 320 mV para el $NADH_2$ a E_o' = – 420 mV para la ferredoxina) y el equilibrio es desfavorable para la liberación de hidrógeno, las reacciones únicamente pueden transcurrir cuando el hidrógeno molecular liberado se va alejando continuamente. Los organismos capaces de liberar H_2 a partir del $NADH_2$ pueden servirse de esta forma elegante de liberación sólo cuando viven en cultivo mixto con bacterias que consuman continuamente el hidrógeno formado. Esto es lo que sucede en la naturaleza. Se habla de un transporte de hidrógeno de una célula a otra (transferencia interespecífica de hidrógeno) y de un tipo especial de simbiosis en las asociaciones microbianas.

Naturalmente, las bacterias capaces de eliminar el hidrógeno del NAD en la forma descrita como H_2, no necesitan formar aceptores del $NADH_2$ a partir del acetil-CoA. Por ello pueden transformar acetil-CoA en acetilfosfato y regenerar ATP en la reacción de la *acetato-quinasa*. Segregan fundamentalmente acetato y en la fermentación de 1 mol de glucosa pueden regenerar hasta 4 moles de ATP (*Ruminococcus albus*, pág. 331).

Papel de los fermentadores en la economía de la naturaleza. Los fermentadores participan esencialmente en el ciclo de la materia en la naturaleza. La celulosa que llega a zonas anaeróbicas de los sedimentos del suelo se fermenta, y se producen productos de fermentación antes indicados, entre ellos casi siempre hidrógeno. El hidrógeno se encuentra al principio de una cadena alimentaria anaeróbica, cuyos productos principales son el metano y/o el sulfhídrico:



En los sedimentos de los lagos de aguas dulces y en la panza de los rumiantes el H_2 se transforma a metano por las bacterias metanogénicas, y en los ecosistemas marinos anaeróbicos a sulfhídrico con sulfato por las bacterias reductoras de sulfatos.

8.1 Fermentación alcohólica por levaduras y bacterias

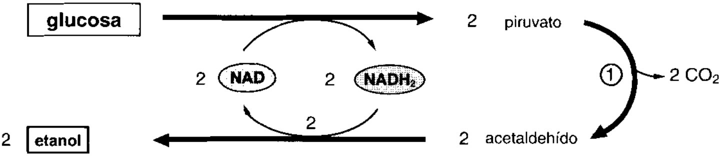
El etanol es uno de los productos de la fermentación de los azúcares más abundante entre los microorganismos. Incluso en las plantas y muchos hongos se almacena etanol en condiciones anaeróbicas. Los principales productores de alcohol son levaduras, sobre todo cepas de *Saccharomyces cerevisiae*. Las levaduras, al igual que la mayoría de los hongos, son organismos de respiración aeróbica; en ausencia de aire fermentan los hidratos de carbono a etanol y anhídrido carbónico. El alcohol aparece también como producto principal o secundario de la fermentación de hexosas o pentosas en muchas bacterias anaeróbicas y aeróbicas facultativas.

Formación de etanol por levaduras

Las levaduras han sido un objeto de investigación preferencial en el estudio de las vías del metabolismo básico antes citadas. Ya GAY-LUSSAC (1815) formuló la transformación de la glucosa a etanol en su forma actual:

$$C_6H_{12}O_6 \longrightarrow 2\ CO_2 + 2\ C_2H_5OH$$

La fermentación normal de la glucosa por la levadura. La fermentación de la glucosa a etanol y anhídrido carbónico por las levaduras (*Saccharomyces cerevisiae*) se realiza a través de la vía de la fructosa-bifosfato. La transformación de piruvato a etanol implica dos pasos. En el primero se descarboxila el piruvato por la *piruvato-descarboxilasa* (1) con participación de la tiaminapirofosfato, formándose acetaldehído; éste se reduce a etanol con $NADH_2$ mediante la *alcohol-deshidrogenasa* (2):



En esta transferencia de hidrógeno se consume el hidrógeno liberado en la deshidrogenación de la triosa-fosfato; el balance de oxidación-reducción queda así equilibrado.

Historia de la investigación de la fermentación por levaduras. Aquí no podemos insistir en las disquisiciones, que hoy día parecen curiosas, de si la formación de alcohol a partir de azúcar era "simplemente una acción química de contacto" o si se trataba de la actividad de seres vivos. L. PASTEUR aclaró definitivamente la cuestión del origen de la fermentación y ya estableció que las levaduras a partir de una cantidad dada de azúcar y bajo condiciones aeróbicas, forman aproximadamente veinte veces más sustancia celular que bajo condiciones anaeróbicas. El hallazgo de que el oxígeno reprime la fermentación se ha convertido, como "efecto PASTEUR", en un ejemplo modelo de la regulación metabólica.

BUCHNER y HAHN observaron en 1896/97 que en un jugo obtenido moliendo con arena de cuarzo y sílice levaduras de cerveza se producía una fermentación de azúcares cuando éste se añadía. Ésta fue la primera realización de un proceso bioquímico complejo fuera de la célula. En jugos de levadura realizaron HARDEN y YOUNG (1926) el descubrimiento de que la fermentación de la glucosa requiere fosfato inorgánico y que se fija en forma de fructosa-1,6-bifosfato. El jugo de levadura fermenta la glucosa según la ecuación de HARDEN-YOUNG:

$$2\ C_6H_{12}O_6 + 2\ P_i \longrightarrow 2\ CO_2 + 2\ C_2H_5OH + 2\ H_2O + \text{fructosa-1,6-bifosfato}$$

Formas de fermentación de NEUBERG. De mucha más importancia que la simplemente histórica son también los métodos y descubrimientos de CARL NEUBERG. Demostró que no sólo la glucosa, sino que también el piruvato, puede ser fermentado por la levadura. Por captación del aldehído con sulfito de hidrógeno pudo demostrarse que el acetaldehído aparece como un producto intermediario. El sulfito de hidrógeno no es prácticamente tóxico para la levadura. Si se añade sulfito de hidrógeno a levadura que está fermentando la glucosa, precipita el acetaldehído como un compuesto de adición:

$$CH_3\text{–}CHO + NaHSO_3 \longrightarrow CH_3\text{–}CHOH\text{–}SO_3Na$$

Debido a ello se forma un nuevo producto de fermentación, la glicerina; simultáneamente disminuye la producción de etanol y anhídrido carbónico.

La fermentación en presencia de sulfito de hidrógeno se ha empleado en la industria para la obtención de glicerina. La producción de glicerina se basa en que el acetaldehído es captado y por tanto no puede funcionar como aceptor de hidrógenos. En lugar del acetaldehído aparece la dihidroxiacetona-fosfato como aceptor de hidrógenos; se reduce a glicerina-3-fosfato y se desfosforila hasta glicerina. La ecuación de la fermentación es la siguiente:

$$\text{glucosa} + \text{sulfito de hidrógeno} \longrightarrow \text{glicerina} + \text{sulfito-acetaldehído} + CO_2$$

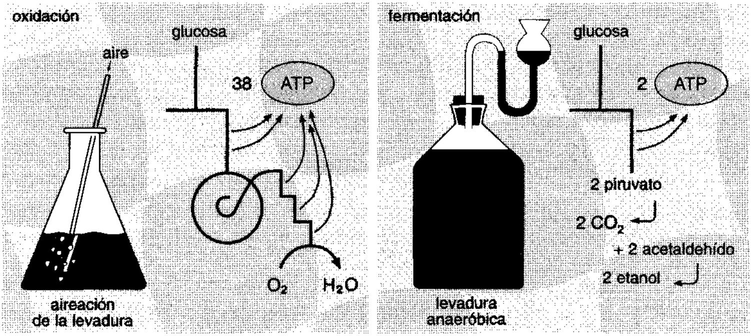
Esta fermentación modificada de la levadura se conoce como **"segunda forma de fermentación de NEUBERG"**. El principio de captar algunos metabolitos durante el proceso metabólico se utiliza de forma general en bioquímica como "procedimiento de captura".

Al añadir una base ($NaHCO_3$, Na_2HPO_4) a una fermentación se llega igualmente a la formación de glicerina, porque el acetaldehído se transforma en etanol y el acetato no puede realizar la función del aceptor de hidrógenos; la ecuación de la fermentación se conoce como **"tercera forma de fermentación de NEUBERG"**:

$$2\ \text{glucosa} + H_2O \longrightarrow \text{etanol} + \text{acetato} + 2\ \text{glicerina} + 2\ CO_2$$

La fermentación normal por las levaduras la denominó NEUBERG como primera forma de fermentación. Aceptaba que el 2-oxopropanal (metilglioxal: CH_3-CO-CHO) que aparece en la rotura no biológica de la fructosa era también un producto intermediario de la fermentación de la glucosa.

Relación de la levadura respecto al oxígeno. El proceso de fermentación de la glucosa por las levaduras es un proceso anaeróbico; no obstante, las levaduras son aeróbicas. Bajo condiciones anaeróbicas las levaduras fermentan de una forma muy intensa pero casi no crecen. Con la aireación se reduce la fermentación en favor de la respiración. En algunas levaduras la fermentación puede reprimirse casi totalmente mediante una aireación intensa (efecto PASTEUR). PASTEUR descubrió este efecto hace ya más de cien años en sus investigaciones acerca de los procesos de fermentación



durante la obtención del vino. El efecto, no obstante, no se limita sólo a las levaduras sino que es una característica de todas las células anaeróbicas facultativas, incluidas las células de los tejidos de los animales superiores.

El balance de la transformación de la glucosa en una experiencia representativa con levaduras se expresa en la tabla 8.1. La aireación determina una disminución del consumo de glucosa y de la producción de etanol y anhídrido carbónico, y permite el crecimiento. Desde el punto de vista energético estos resultados parecen comprensibles e indican un mecanismo de regulación extraordinariamente justificado: en condiciones anaeróbicas únicamente se forman 2 moles de ATP por mol de glucosa frente a los 3 moles de ATP durante la respiración de la glucosa. La célula se adapta por tanto, mediante la regulación de la transformación del sustrato, al grado de eficacia en la ganancia energética determinada por ambas condiciones.

La tabla 8.1. indica en la tercera columna los resultados de una experiencia en la que la levadura se ha incubado en condiciones aeróbicas en pre-

Tab. 8.1 Balance del consumo de glucosa por levaduras en incubación aeróbica y anaeróbica (a 25°C) ± 0,4 mmol 2,4-dinitrofenol (DPN)/1.

		Anaeróbico	Aeróbico	Aeróbico + DNP
Utilización de la glucosa		– 3,085	– 1,950	– 3,020
Degradación por	fermentación	– 1,945	– 0,343	– 1,387
	oxidación	—	– 0,356	– 0,556
Degradación de la glucosa		– 1,945	– 0,699	– 1,943
Asimilación		– 1,145	– 1,251	– 1,077

Las cifras dan el consumo de glucosa por unidad de tiempo (de F. Lynen, K.J. Netter, A. Schuegraf y G. Stix, Phosphatkreislauf und Pasteur-Effekt, Octavo coloquio de la sociedad de química fisiológica, Mosbach, Springer-Verlag, Berlín, 1958).

sencia de 0,4 mmoles de 2,4-dinitrofenol (DNP) por litro. El DNP es un "desacoplante" de la fosforilación de la cadena respiratoria; inhibe el acoplamiento entre el transporte de electrones y la fosforilación oxidativa y deja a la respiración sin el control de la fosforilación. Por adición de DNP se elimina prácticamente la fosforilación en la cadena respiratoria, y el hidrógeno liberado en el ciclo de los ácidos tricarboxílicos queda energéticamente sin utilizar. Únicamente el "fosfato rico en energía" producto de la rotura del succinil-CoA puede ser utilizado. El resultado de estas experiencias, el aumento del consumo de glucosa bajo condiciones anaeróbicas, está de acuerdo con la acción desacoplante del DNP.

En la reacción de PASTEUR parecen estar implicados varios **mecanismos de regulación** que actúan en el mismo sentido. Uno se desarrolla a nivel del proceso de fosforilación y puede explicarse por una competencia hacia el ADP y el fosfato inorgánico (P_i). La deshidrogenación que tiene lugar en la descomposición del gliceraldehído-fosfato requiere fosfato y ADP:

$$\text{gliceraldehído-3-fosfato} + \text{NAD} + \text{ADP} + P_i \longrightarrow \text{3-fosfoglicerato} + \text{NADH}_2 + \text{ATP}$$

La transformación del sustrato (glucosa) por la vía de la fructosabifosfato depende por tanto de la presencia de ADP y fosfato; sin ADP y sin fosfato no tiene lugar ninguna deshidrogenación del gliceraldehídofosfato. No obstante, bajo condiciones aeróbicas la fosforilación en la cadena respiratoria compite por el ADP y el fosfato e igualmente conduce a la formación de ATP. Parece plausible que el flujo de glucosa, y por tanto también la formación de etanol, se vean limitados por la disminución de las concentraciones intracelulares del ADP y el fosfato. Si se desacopla la fosforilación respiratoria mediante el dinitrofenol, quedan de nuevo ADP y fosfato disponibles para la deshidrogenación del gliceraldehído-fosfato y aumenta el consumo de glucosa a los niveles aeróbicos (Tab. 8.1).

Para la reacción de PASTEUR hay otro mecanismo de regulación responsable. El enzima *fosfofructoquinasa* se inhibe alostéricamente por el ATP. Sobre esta inhibición por adenilación insistiremos en el apartado "Fosfofructoquinasa y efecto PASTEUR" (pág. 572).

Explicación de la ecuación de fermentación según HARDEN y YOUNG. El extracto de levaduras transforma la glucosa según la ecuación de fermentación de HARDEN-YOUNG. La acumulación de fructosa-1,6-bifosfato se debe a que el ATP en exceso en el sistema enzimático no se consume en reacciones que requieren energía, como en la célula viva, sino que se mantiene. En el extracto de levaduras no se encuentra ninguna *fosfatasa*. Como consecuencia, el ADP debe ser regenerado constantemente por la fosforilación de la glucosa en exceso, o bien de la fructosa-6-fosfato.

Utilización de las levaduras. El hombre ha utilizado a las levaduras para muchos fines. Ya antiguamente se eligió entre el gran número de especies, razas y cepas aquéllas más apropiadas. Las levaduras que respiran poco, predominantemente fermentadoras, se utilizaban como **"levaduras de fondo o bajas"** para la preparación de la cerveza. Las levaduras que se utilizaban para la formación de etanol y vino así como la levadura de panadería son predominantemente **"levaduras superficiales o altas"**.

La **levadura de panadería** (*Saccharomyces cerevisiae*) debe hinchar la masa por producción de anhídrido carbónico, y por tanto debe fermentar intensamente. Se obtiene en tanques bajo una aireación intensa. Como producto secundario se forma siempre etanol. Mediante variaciones en la aireación y en el suministro de azúcares pueden modificarse también los rendimientos relativos en cuanto a levadura y alcohol. En el "proceso de adición" se va añadiendo continuamente el azúcar pero tan lentamente que limita el crecimiento de la levadura. De este modo se evita la aparición de productos de fermentación y el azúcar se utiliza en su totalidad para el crecimiento. Como fuente de nitrógeno se utiliza amonio. Las levaduras asimilan los factores de crecimiento a partir de extractos de trigo.

Las **levaduras de cervecería** son generalmente levaduras de fondo (cervezas de Munich, Pils) y en más raras ocasiones de levaduras superficiales (cerveza blanca, ale, porter). En Centroeuropa la cerveza se obtiene, preferentemente, a partir de cebada; como material de partida se elige una cebada de fermentación con el contenido proteico más elevado posible y con un contenido alto en almidón. Como la levadura no tiene ninguna *amilasa* no puede fermentar el almidón, sino sólo azúcares; y el almidón de la cebada debe transformarse primero en azúcar. Para esta amilolisis se emplea la *amilasa* propia de la cebada que se forma durante el proceso de germinación de la semilla. Para ello se deja en primer lugar que los granos de cebada se hidraten y comiencen a germinar; la malta verde así formada se seca ("fija") a una temperatura determinada en la que se interrumpe el proceso de germinación pero a la que los enzimas permanecen activos. La malta fija se muele y se suspende en agua. A temperaturas intermedias el almidón se hidroliza en maltosa formándose el mosto. Se sacan las glúmulas que se encuentran en el mosto, se añade el lúpulo, se deja que hierva, se enfría y se fermenta entonces con levadura que se ha cultivado previamente en los tanques de fermentación.

Para obtener **alcohol por fermentación** (etanol) se parte de los residuos de la fabricación de azúcar de caña (melazas) o a partir de patata. Alcohol mucho más barato se puede obtener a partir de los hidrolizados de las lejías sulfíticas de las fábricas de papel. Entre los azúcares contenidos en la madera únicamente pueden fermentarse a alcohol las hexosas, las pentosas se utilizan en un proceso posterior mediante otras levaduras (*Endomyces* *lactis* o bien especies de *Torula*) que las emplean como fuente de carbono; estas levaduras se utilizan como alimentación animal rica en proteínas.

Muchos **vinos** alemanes se producen por una fermentación espontánea del mosto a partir de la levadura *Kloeckera*. Para reprimir la fermentación incontrolada por levaduras silvestres se añaden frecuentemente levaduras cultivadas puras o mezclas de *Kloeckera* y *Saccharomyces* de determinadas regiones vinícolas. De más importancia para el aroma del vino que la propia levadura utilizada son, no obstante, las cepas de vino (Riesling, Sylvaner, Müller-Thurgau, Scheurebe, Kerner entre otros en Alemania) así como los factores climáticos y edáficos bajo los cuales ha crecido la uva.

Todos los líquidos fermentados por levaduras contienen **alcoholes**: propanol, 2-butanol, 2-metilpropanol, alcohol amílico (pentanol) y alcohol isoamílico (3-metilbutanol). Son productos del metabolismo fermentativo normal de la levadura y no se presentan únicamente en los medios nutritivos complejos ricos en aminoácidos. Los componentes principales de los alcoholes son productos secundarios del metabolismo de la isoleucina, la leucina y la valina.

Formación de etanol por bacterias

La vía que sigue la levadura para la formación de etanol (vía de la fructosabifosfato, *piruvato-descarboxilasa*) la sigue entre las bacterias únicamente *Sarcina ventriculi*.

A partir del pulque, el jugo fermentado del agave (*Agave americana*), se aisló en Méjico una bacteria bacilar, de flagelación polar, móvil, capaz de formar etanol. Esta bacteria, *Zymomonas mobilis*, descompone la glucosa a través de la vía del 2-ceto-3-desoxi-6-fosfogluconato e hidroliza al piruvato mediante la *piruvato-descarboxilasa* hasta acetaldehído y CO_2. El acetaldehído se reduce a etanol. Etanol, anhídrido carbónico y pequeñas

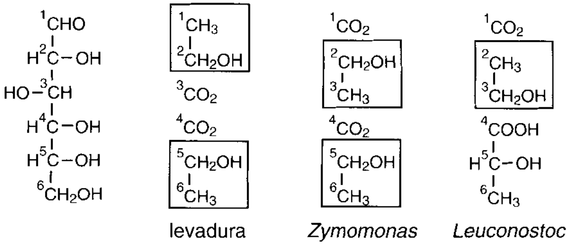


Fig. 8.1 Procedencia de los átomos de carbono del etanol a partir del esqueleto carbonado de la glucosa en su fermentación.

cantidades de ácido láctico son los únicos productos de fermentación. Considérese que en el alcohol de agave se encuentran los átomos de carbono de la glucosa 2 y 3 así como 5 y 6, mientras que en el alcohol de levadura, por el contrario, se encuentran los átomos de carbono 1 y 2, así como el 5 y 6 (Fig. 8.1).

En las fermentaciones de algunas Enterobacteriáceas y clostridios se forma etanol como producto secundario. El nivel previo al etanol, el acetaldehído, no se libera, no obstante, a partir del piruvato directamente por la *piruvato-descarboxilasa* sino que se forma por reducción del acetil-CoA.

Las bacterias lácticas heterofermentativas (p. ej. *Leuconostoc mesenteroides*) forman alcohol a través de una vía totalmente distinta. La glucosa se descompone mediante los primeros pasos de la vía de la pentosafosfato hasta pentosafosfato. La *fosfocetolasa* actúa sobre la xilulosa-5-fosfato:

$$\text{xilulosa-5-fosfato} + P_i \longrightarrow \text{acetilfosfato} + \text{gliceraldehído-3-fosfato}$$

El acetilfosfato así formado se reduce mediante la *acetaldehído-deshidrogenasa* y la *alcohol-deshidrogenasa* hasta etanol. El otro producto de escisión, el gliceraldehído-3-fosfato, se reduce a lactato a través del piruvato.

8.2 Fermentación láctica y Lactobacteriáceas

Las bacterias del ácido láctico se reúnen en la familia de las Lactobacteriáceas. A pesar de que el grupo morfológicamente se presenta como poco homogéneo, compuesto por bacilos cortos y largos, así como por cocos, es un grupo relativamente bien caracterizado fisiológicamente. Todos los pertenecientes a él son Gram positivos, no forman esporas (con la excepción de *Sporolactobacillus inulinus*) y son inmóviles (con excepciones). Para la obtención de energía dependen exclusivamente de los hidratos de carbono y excretan ácido láctico (lactato). En contraposición a las Enterobacteriáceas también productoras de lactato éstas son fermentadoras obligadas. No contienen heminas (citocromo, *catalasa*). A pesar de su ausencia, las Lactobacteriáceas pueden crecer con oxígeno atmosférico; son anaeróbicas pero aerotolerantes; una bacteria que crezca aeróbicamente sin *catalasa* es probablemente una bacteria del ácido láctico.

Requerimientos nutritivos y crecimiento. Otra característica de las bacterias lácticas es la necesidad de requerimientos nutritivos. Ningún representante es capaz de reproducirse en un medio mineral con glucosa y sales amónicas. La mayoría necesitan una serie de vitaminas (lactoflavina, tiamina, ácido pantoténico, ácido nicotínico, ácido fólico, biotina) y aminoácidos, purinas y pirimidinas. Por ello se cultivan preferentemente sobre medios de cultivo complejos, que contienen cantidades relativamente altas de extracto de levadura, jugo de tomate, suero e incluso sangre. Se ha visto sorprendentemente que algunas bacterias del ácido láctico (entre otros fermentadores) forman citocromos cuando se desarrollan sobre medios de cultivo que contienen sangre e incluso son capaces de desarrollar una fosforilación en la cadena respiratoria. Por ello, a las bacterias lácticas, lo que les falta es la capacidad para poder sintetizar la porfirina; si se añaden porfirinas a los medios de cultivo, algunas bacterias lácticas son capaces de formar los pigmentos con el grupo hemo correspondiente.

Hay que considerar, por tanto, a las bacterias del ácido láctico como un grupo metabólico que probablemente como consecuencia de su especialización para desarrollarse sobre leche y otros hábitats ricos en nutrientes y requerimientos nutritivos, han perdido la capacidad para la síntesis de muchos metabolitos. Por otra parte, disponen de una capacidad que les falta a la mayoría de los microorganismos; son capaces de utilizar el azúcar de la leche (lactosa). Esta capacidad la comparten con las bacterias intestinales (p. ej. *Escherichia coli*). La lactosa no se presenta aparentemente en el reino vegetal; la forman los mamíferos y la excretan con la leche, o bien la captan mediante la leche. En la utilización de la lactosa hay que ver por tanto una adaptación a las condiciones ambientales del tracto intestinal de los mamíferos. La lactosa es un disacárido que se escinde antes de introducirse en las vías de degradación de las hexosas:

$$\text{lactosa} + H_2O \xrightarrow{\beta\text{-galactosidasa}} \text{D-glucosa} + \text{D-galactosa}$$

El enzima *β-galactosidasa* se presenta en muy pocas bacterias. Uno de los productos de escisión, la galactosa se transforma, tras su fosforilación por una *galactoquinasa* específica, en glucosa-1-fosfato por isomerización.

Debido a la producción de grandes cantidades de lactato hay que tamponar muy bien el medio de cultivo. Por lo general se añade carbonato cálcico; sobre un agar nutritivo al que se le haya añadido una suspensión de carbonato cálcico ("agar-yeso") puede detectarse la producción de ácido alrededor de las colonias por los halos transparentes que las rodean.

Presencia y hábitats. Los elevados requerimientos nutritivos y el tipo de ganancia energética (fermentación pura) están en consonancia con la distribución de las bacterias lácticas en la naturaleza. En el suelo y en el agua no se encuentran casi nunca. Sus hábitats naturales son:

a) Leche y sus productos de elaboración (*Lactobacillus lactis, L. bulgaricus, L. helveticus, L. casei, L. fermentum, L. brevis*; *Lactococcus lactis, Lactococcus diacetilactis*);
b) Plantas intactas y en descomposición (*Lactobacillus plantarum, L. delbrückii, L. fermentum, L. brevis*; *Lactococcus lactis*; *Leuconostoc mesenteroides*);

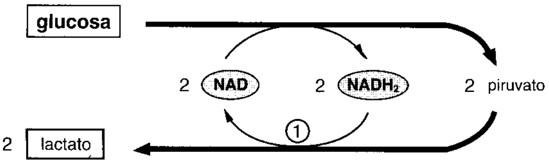
c) Intestino y mucosas de hombre y animales (*Lactobacillus acidophilus, Bifidobacterium; Enterococcus faecalis, Streptococcus salivarius, S. bovis, S. pyogenes, S. pneumoniae*).

Enterococcus faecalis es un habitante normal del intestino humano, *S. bovis* se halla en los rumiantes. Muchos estreptococos son comensales inocuos de las mucosas de la boca, de los órganos respiratorios, urinarios y sexuales. Pertenecen a la llamada flora epitelial. Su presencia impide que la piel sea colonizada por otros microorganismos, posiblemente patógenos. Si se dificulta el crecimiento de las bacterias lácticas de los epitelios, por ejemplo debido a tratamientos intensivos con antibióticos (penicilina), con frecuencia tiene lugar una colonización de las mucosas con dermatófitos patógenos, p. ej. con *Candida albicans*. Existe por tanto una base para dudar de la eficacia de los baños excesivamente frecuentes con detergentes. Otros estreptococos son patógenos, parásitos de la sangre muy virulentos.

Mediante la formación de grandes cantidades de lactato y debido a su tolerancia frente a los ácidos, las bacterias lácticas se desarrollan rápidamente cuando las condiciones ambientales son apropiadas. Por este motivo resulta fácil enriquecer y aislar bacterias lácticas sobre medios de cultivo selectivos. Los llamados "cultivos puros naturales" se encuentran en la leche ácida y en productos lácticos, pan fermentado, col fermentada, y en hábitats semejantes.

Degradación de los hidratos de carbono y productos de fermentación. Según su capacidad de fermentar la glucosa exclusivamente a lactato o de dar simultáneamente también otros productos de fermentación y anhídrido carbónico, se divide a las lactobacterias en homofermentativas y heterofermentativas (Tab. 8.2). Esta antigua diferenciación está de acuerdo con las vías de degradación de los azúcares, básicamente distintas.

Fermentación láctica homofermentativa. Las bacterias lácticas homofermentativas forman ácido láctico puro o casi puro (90%). Descomponen la glucosa utilizando la vía de la fructosa-bifosfato, y por lo tanto disponen de los enzimas necesarios incluyendo la *aldolasa* y transfieren el hidrógeno liberado en la deshidrogenación del gliceraldehído-3-fosfato hasta el piruvato:



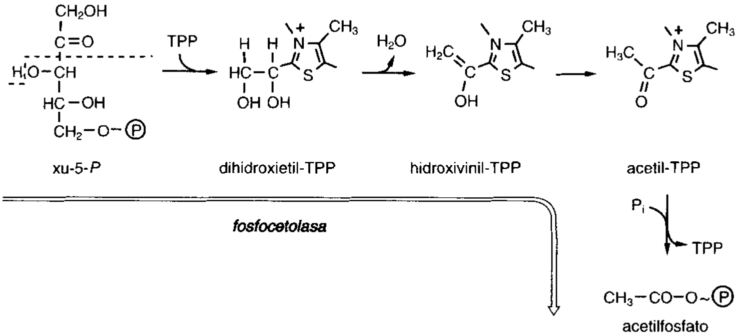
El que se forme D(-), L(+) o DL-lactato depende de la estereoespecificidad del enzima implicado, la *lactato-deshidrogenasa* (l) y de la presencia de una *lactato-racemasa*. Una pequeña parte del piruvato se descarboxila hasta acetato, etanol y anhídrido carbónico, así como hasta acetoína. Los resultados de algunos experimentos parecen indicar que la magnitud de la formación de productos secundarios depende aparentemente de la presencia de oxígeno.

Tab. 8.2 Bacterias del ácido láctico ordenadas según su morfología (cocos o bacilos) y según su tipo fermentativo.

Cocos	Bacilos
Homofermentativas: $C_6H_{12}O_6 \longrightarrow$	$2\ CH_3\text{–}CHOH\text{–}COOH$
Estreptococos *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* var. *diacetilactis* *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* *Enterococcus faecalis* *Enterococcus salivarius* subsp. *salivarius* *Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus* *Streptococcus pyogenes*	Lactobacilos Termobacterias (temp. ópt. 40°C; no crecen a 15°C) *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *delbrueckii* *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *lactis* *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* *Lactobacillus helveticus* *Lactobacillus acidophilus* *Lactobacillus salivarius*
	Estreptobacterias (temp. ópt. 30-37°C; siempre crecen a 15°C) *Lactobacillus casei* *Lactobacillus alimentaris* *Lactobacillus coryniformis* *Lactobacillus plantarum*
Heterofermentativas: $C_6H_{12}O_6 \longrightarrow$	$CH_3\text{–}CHOH\text{–}COOH + CH_3\text{–}CH_2OH + CO_2$ (o $CH_3\text{–}COOH$)
Estreptococos *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *mesenteroides* *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *dextranicum* *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *cremoris* *Leuconostoc lactis*	Lactobacilos *Lactobacillus bifermentans* *Lactobacillus brevis* *Lactobacillus fermentum* *Lactobacillus kandleri* *Lactobacillus viridescens*

En esta tabla se indican los nombres válidos actuales de las bacterias lácticas. En el texto se mencionan los nombres abreviados más corrientes.

Fermentación láctica heterofermentativa. Las bacterias lácticas heterofermentativas no disponen de los enzimas principales de la vía de la fructosabifosfato, la *aldolasa* y la *triosafosfato-isomerasa.* La degradación inicial de la glucosa sigue exclusivamente la vía de la pentosafosfato, esto es, a través de la glucosa-6-fosfato, del 6-fosfogluconato y de la ribulosa-5-fosfato (Fig. 7.4; 8.2). Éste se transforma mediante una *epimerasa* a xilulosa-5-fosfato y en una reacción dependiente de la tiaminapirofosfato se escinde a través de la *fosfocetolasa* apareciendo gliceraldehído-fosfato y acetilfosfato:



Células lavadas y que no estén en crecimiento de *Leuconostoc mesenteroides* fermentan la glucosa casi estequiométricamente según la reacción

$$C_6H_{12}O_6 \longrightarrow CH_3\text{–}CHOH\text{–}COOH + CH_3\text{–}CH_2OH + CO_2$$

hasta lactato, etanol y anhídrido carbónico. En ellas el acetilfosfato se reduce por tanto a través del acetil-CoA y del acetaldehído hasta etanol (Fig. 8.2.). Otras bacterias heterofermentativas transforman parcial o totalmente el acetilfosfato hasta acetato, transfiriendo el enlace fosfato rico en energía al ADP produciendo ATP. El hidrógeno en exceso se transfiere en este caso a la glucosa, formándose entonces manitol. El gliceraldehído-fosfato se transforma a lactato a través del piruvato. La ribosa se fermenta hasta lactato y acetato por *Leuconostoc mesenteroides.*

Las bacterias heterofermentativas fermentan la fructosa formando lactato, acetato, anhídrido carbónico y manitol.

$$3\ \text{fructosa} \longrightarrow \text{lactato} + \text{acetato} + CO_2 + 2\ \text{manitol}$$

Aquí la fructosa se utiliza como aceptor de equivalentes reductores en exceso:

$$\text{fructosa} + NADH_2 \longrightarrow \text{manitol} + NAD$$

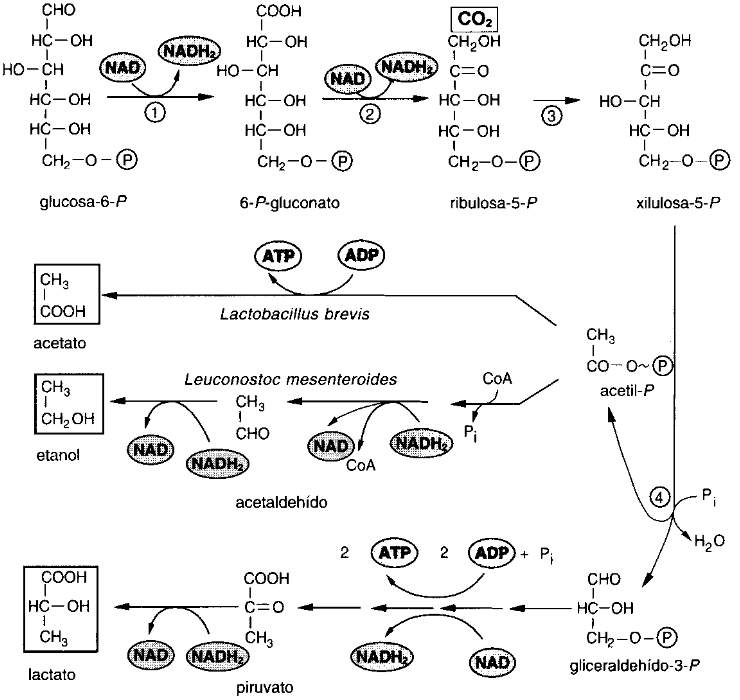

glucosa-6-P
NAD
NADH₂
①
6-P-gluconato
NAD
NADH₂
②
CO₂
ribulosa-5-P
③
xilulosa-5-P
ATP
ADP
acetato
Lactobacillus brevis
acetil-P
Leuconostoc mesenteroides
CoA
Pᵢ
etanol
NAD
NADH₂
NAD
NADH₂
CoA
acetaldehído
④
Pᵢ
H₂O
2 ATP
2 ADP + Pᵢ
lactato
NAD
NADH₂
piruvato
NADH₂
NAD
gliceraldehído-3-P

Fig. 8.2 La fermentación láctico heterofermentativa de *Lactobacillus brevis* y *Leuconostoc mesenteroides*. Enzimas implicados: (1) *glucosa-6-fosfato-deshidrogenasa*; (2) *fosfogluconato-deshidrogenasa*; (3) *epimerasa*; (4) *fosfocetolasa*. El acetilfosfato puede se transformado mediante la *acetato-quinasa* con fosforilación de ADP (*L. brevis*) o ser reducido a etanol (*L. mesenteroides*). La oxidación del gliceraldehído-fosfato tiene lugar por la vía habitual (vía de la fructosa-bifosfato).

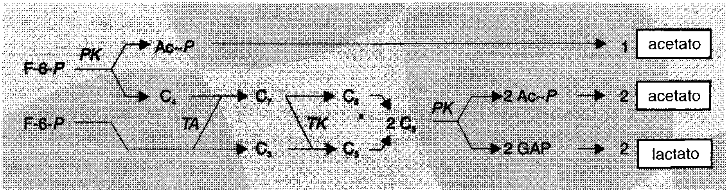
Lactobacillus plantarum (sin. *pentosus* o *arabinosus*) fermenta la glucosa homofermentativamente, mientras que transforma las pentosas a lactato y acetato mediante la *fosfocetolasa*. Hay que señalar que incluso una bacteria homofermentativa tan acusada como *Lactobacillus casei* puede fermentar la glucosa homofermentativamente, pero que transforma la ribosa heterofermentativamente hasta acetato y lactato. La ribosa induce a la *fosfocetolasa*. Células crecidas sobre ribosa y lavadas fermentan a la glucosa heterofermentativamente.

Fermentación de *Bifidobacterium*. La bacteria láctica heterofermentativa *Bifidobacterium bifidum* recibe su nombre de la forma en V o en Y de sus células (bifidus L = bifurcado, bífido, partido). Se conoce sobre todo porque predomina en la flora intestinal de los lactantes, y sobre todo en primer lugar en los niños alimentados con leche materna. Esta dependencia en cuanto a la alimentación del lactante se debe a la necesidad de esta bacteria de utilizar algunos azúcares, que contienen *N*-acetilglucosamina, la cual sólo se encuentra en la leche humana y no en la de vaca. Los miembros pertenecientes al género *Bifidobacterium* son anaeróbicos estrictos, no son aerotolerantes, y para su crecimiento requieren una atmósfera rica en anhídrido carbónico (10% de CO_2). Desde que se conocen estas características no usuales para las bacterias lácticas se han encontrado bifidobacterias también en la flora intestinal de los adultos y en otros muchos hábitats, incluso en limos; actualmente se diferencian muchas especies.

Bifidobacterium transforma la glucosa según:

$$2\ C_6H_{12}O_6 \longrightarrow 2\ CH_3\text{–}CHOH\text{–}COOH + 3\ CH_3\text{–}COOH$$

Fermenta la glucosa a través de una vía colateral de la *fosfocetolasa*. No utiliza ni la *aldolasa* ni la *glucosa-6-fosfato-deshidrogenasa*, pero dispone de una *fosfocetolasa* activa, que hidroliza a la fructosa-6-fosfato y a la xilulosa-5-fosfato hasta acetilfosfato y eritrosa-4-fosfato o bien gliceraldehído-3-fosfato. La hexosa se transforma según la siguiente vía:



Símbolos: *PK* = *fosfocetolasa*; *TA* = *transaldolasa*; *TK* = *transcetolasa*; Ac~*P* = acetilfosfato; GAP = gliceraldehído-3-fosfato.

Utilización doméstica, agrícola y en la elaboración de alimentos. Si se dejan sin manipular disoluciones no estériles que contengan azúcares y también fuentes de nitrógeno complejas y requerimientos nutritivos en ausencia de aire o formando una gruesa capa, las bacterias del ácido láctico predominarán en ellas en un plazo breve de tiempo. Bajan los valores de pH por debajo de 5 y así impiden el crecimiento de otras bacterias anaeróbicas que no son capaces de desarrollarse a estos grados de acidez. El tipo de bacterias lácticas que predominan en estos cultivos de enriquecimiento depende de condiciones especiales. A la acción esterilizante y conservadora de la acidificación deben las bacterias lácticas su utilización en agricultura, usos domésticos, en la industria láctica y en la elaboración de productos lácticos.

Ensilados. Las bacterias lácticas, ampliamente extendidas entre los materiales vegetales, tienen un papel importante en la conservación de los alimentos animales. Hojas de remolacha, maíz, patatas, cereales o alfalfa se comprimen en silos. Para elevar la relación C/N se añaden melazas y para ayudar a los lactobacilos acidotolerantes y a los estreptococos desde un principio, se añade también ácido fórmico o ácidos minerales. A continuación tiene lugar una fermentación láctica controlada.

La **col fermentada** es igualmente un producto de la fermentación láctica. La col blanca finamente troceada, a la que se añade un 2 o un 3% de sal de cocina, sufre una fermentación láctica espontánea si no hay oxígeno atmosférico; en ella participan en primer lugar *Leuconostoc* con formación de anhídrido carbónico, y posteriormente *Lactobacillus plantarum*.

Productos lácteos. En la industria que elabora los productos lácticos tienen un papel decisivo las bacterias lácticas, como acidificantes y dando el sabor característico. Por lo general se parte de leche o nata, bien estéril o bien pasteurizada, y se añaden cultivos puros como iniciadores o "starters". La mantequilla de la nata ácida se obtiene a partir de la nata por adición de *Streptococcus lactis*, *S. cremoris* y *Leuconostoc cremoris* que la acidifican y aromatizan por formación de diacetilo (pág. 320).

Los starters mesófilos o termófilos se utilizan para coagular la caseína en la fabricación del requesón o queso fresco, p. ej. de los quesos alemanes del Harz y de Mainz. Los primeros contienen *Lactococcus lactis* (subsp. *lactis* y subsp. *cremoris*), *Lactococcus diacetilactis* y *Leuconostoc cremoris*, y la temperatura de incubación es de 20 a 30°C. Los starters termófilos contienen *Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus*, *Lactobacillus delbrueckii* (subsp. *bulgaricus* o subsp. *lactis*) y/o *Lactobacillus helveticus*, y la temperatura es de 32 a 45°C. Para la fabricación de los quesos duros o de corte se precipita la caseína por el cuajo; en paralelo se da una acidificación por cultivos mesófilos. En la maduración del queso participan bacterias lácticas, y según el tipo de queso bacterias propiónicas (queso suizo, queso Tilsiter) o mohos (queso Roquefort), así como enzimas propios de la leche.

Para fabricar los tipos de **leches ácidas** comerciales se utilizan igualmente cultivos iniciadores, que contienen bacterias lácticas formadoras de ácidos y sustancias aromáticas. Una de ellas, el **suero de mantequilla**, muy rica en aromas, se obtiene por adición de mantequilla de nata ácida obtenida mediante los starters anteriores; además de ácido láctico contiene también ácido acético, acetoína y diacetilo. El **yogur** se compone de leche completa pasteurizada y homogeneizada, que se ha inoculado con

Streptococcus thermophilus y *Lactobacillus bulgaricus*, manteniéndose en incubación durante un período breve de tiempo (2-3 horas) a 43-45 °C. Con el nombre de **bioyogur** se encuentra en el mercado una leche ácida que se acidifica mediante *Lactobacillus acidophilus* y *Streptococcus termophilus*. El **kéfir** es una leche que contiene ácidos y etanol. La leche (de vaca, de oveja o de cabra) se inocula con granos de kéfir. Éstos están compuestos por una comunidad aún no bien identificada de lactobacilos, estreptococos, *Leuconostoc* y levaduras. La acidificación tiene lugar a 15-22°C y dura entre 24-36 horas. Para preparar el **kumiss** se parte normalmente de leche de burra y se inocula con un cultivo de *Lactobacillus bulgaricus* y una levadura, *Torula*.

El **ácido láctico puro** que se requiere para diversos procesos industriales y como aditivo en la alimentación se obtiene por fermentación. La leche o el suero son fermentados por *Lactobacillus casei* y *L. bulgaricus*. Para la fermentación de la glucosa y de la maltosa se utilizan *L. delbrueckii*, *L. leichmannii* o *Sporolactobacillus inulinus*. Como fuente de los requerimientos nutritivos acostumbran a utilizarse melazas y malta.

La formación de ácido en la **masa ácida**, el origen de nuestro pan de centeno, se debe a bacterias lácticas, sobre todo a *L. plantarum* y *L. coryniformis*, y el que crezca la masa se debe a la producción de CO_2 por levaduras.

Se utilizan también cultivos starters de lactobacilos y micrococos en la elaboración de **productos cárnicos** (salami, servelat). Las bacterias aseguran la conservación de los embutidos crudos que no hace falta cocer debido a la formación de ácido láctico y al descenso en el valor del pH.

8.3 Fermentación propiónica y propionibacterias

Localización, distribución, aislamiento y ordenación sistemática. Las propionibacterias son bacterias de la panza y del intestino de los rumiantes (vacas, corderos); participan en la panza y en la formación de ácidos grasos, principalmente de ácido propiónico y de ácido acético. A ellas se debe que la gran parte del lactato formado en las diversas fermentaciones de la panza se transforme en propionato. No se encuentran ni en la leche ni pueden aislarse del suelo o de las aguas. Para su aislamiento se enriquece en bacterias del ácido propiónico bajo condiciones anaeróbicas en un medio de cultivo con lactato y extracto de levadura que se ha inoculado con queso suizo. Llegan al queso suizo, en cuya maduración y sabor tienen una participación decisiva, a través de los fermentos del cuajo, que se añaden en la elaboración del queso y en la coagulación de la leche. El cuajo es un extracto acuoso del estómago de los terneros que contiene numerosas propionibacterias viables. Se distinguen varias especies, de las cuales *Propionibacterium freudenreichii* y su subespecie *shermanii*, así como *P. acidipropionici* (anteriormente *P. pentosaceum*) son los más conocidos. El agente causal del acné, una inflamación del folículo capilar de la piel humana es también una propionibacteria (*P. acnes*). Además del género *Propionibacterium*, entre las bacterias formadoras de propionato se cuentan también *Veillonella alcalescens* (= *Micrococcus lactilyticus*), *Clostridium propionicum*, *Selenomonas* y *Micromonospora*. El propionato también está formado por otras bacterias que lo secretan como producto de fermentación.

Crecimiento y metabolismo del género *Propionibacterium*. El género *Propionibacterium* se encuentra entre las bacterias corineformes (pág. 101 y sig.). Las especies del género *Propionibacterium* son bacilos inmóviles, Gram positivos, incapaces de formar esporas. Bajo condiciones desfavorables de crecimiento aparecen con frecuencia formas de maza. Las propionibacterias no crecen sobre medios de cultivo sólidos expuestos al aire. Debido a su intolerancia frente al oxígeno atmosférico y a la capacidad de regenerar fermentativamente ATP en condiciones anaeróbicas y de crecer en ellas, las propionibacterias se consideraron como fermentadores estrictos. Se sabía desde hacía tiempo que disponen de enzimas hemínicos como los citocromos y la *catalasa*. Efectivamente, los pertenecientes al género *Propionibacterium* comprobados hasta el momento son capaces de crecer tanto anaeróbica como aeróbicamente. Bajo condiciones de aireación controladas el rendimiento de células es varias veces superior que bajo condiciones estrictamente anaeróbicas. No obstante, durante el crecimiento aeróbico la velocidad de difusión del oxígeno desde la fase gaseosa hasta la suspensión bacteriana no debe superar a la tasa de respiración. Presiones parciales de O_2 medibles actúan como tóxicos; por tanto, *Propionibacterium* debe considerarse como un microaerotolerante. Bajo condiciones anaeróbicas, los pertenecientes al género *Propionibacterium* fermentan la glucosa, la sacarosa, la lactosa y la pentosa, así como el lactato, el malato, la glicerina y otros sustratos hasta propionato. La degradación de las hexosas sigue la vía de la fructosa-bifosfato.

Con ocasión de la investigación de la fermentación de la glicerina por *Pronionibacterium acidi-propionici* descubrieron WOOD y WERKMAN (1936) que tiene lugar una **fijación de anhídrido carbónico** que es determinable en el balance. El carbono fijado se encontraba en el succinato secretado; se trataba de una carboxilación del piruvato con formación de ácidos tricarboxílicos. A esta carboxilación se la denomina como reacción de WOOD-WERKMAN. No se limita a las propionibacterias, sino que está ampliamente extendida entre los animales, las plantas y todos los organismos heterótrofos. Las transformaciones bioquímicas implicadas se han considerado anteriormente en la "gluconeogénesis" (pág. 274 y sig.).

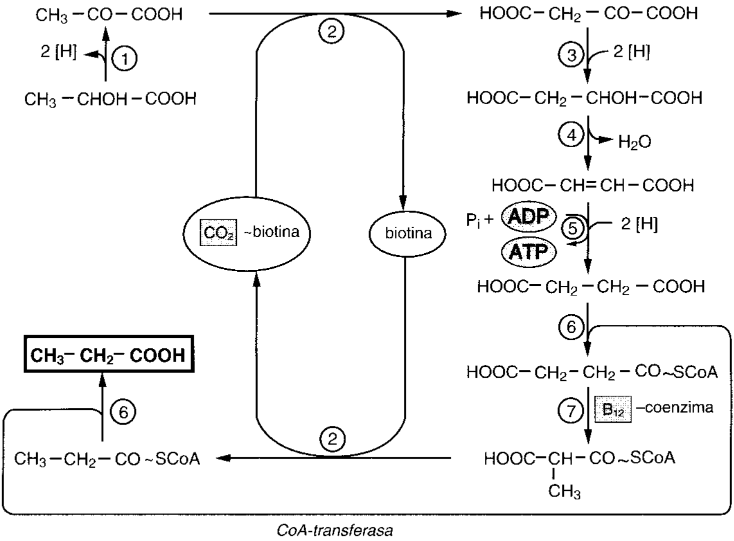

CH3–CO–COOH
2 [H]
①
CH3–CHOH–COOH
②
HOOC–CH2–CO–COOH
③
2 [H]
HOOC–CH2–CHOH–COOH
④
H2O
HOOC–CH=CH–COOH
Pi + ADP
⑤
2 [H]
ATP
HOOC–CH2–CH2–COOH
⑥
HOOC–CH2–CH2–CO~SCoA
⑦
B12 –coenzima
HOOC–CH–CO~SCoA
CH3
CO2 ~biotina
biotina
CH3–CH2–COOH
⑥
CH3–CH2–CO~SCoA
②
CoA-transferasa

Fig. 8.3 Vía del metilmalonil-CoA de formación de propionato. Enzimas implicados: (1) *lactato-deshidrogenasa*; (2) *metilmalonil-CoA-carboxitransferasa*; (3) *malato-deshidrogenasa*; (4) *fumarasa*; (5) *fumarato-reductasa* (que conduce a regeneración de ATP por translocación de protones); (6) *CoA-transferasa*; (7) *metilmalonil-CoA-mutasa.*

Bioquímica de la formación del ácido propiónico (vía del metilmalonil-CoA). La formación de propionato a partir de lactato sigue la siguiente ecuación de transformación:

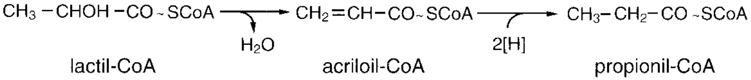
$$3\ CH_3\text{–}CHOH\text{–}COOH \longrightarrow 2\ CH_3\text{–}CH_2\text{–}COOH + CH_3\text{–}COOH + CO_2 + H_2O$$

La reducción del lactato o del piruvato hasta el propionato sigue una vía que, debido al producto intermediario característico, se denomina vía del metilmalonil-CoA (Fig. 8.3). El piruvato se carboxila con participación de un complejo biotina-anhídrido carbónico mediante la *metil-malonil-CoA-carboxitransferasa* con formación de oxalacetato y a continuación se reduce a succinato, pasando por malato y fumarato. Este paso va acoplado a una fosforilación en el transporte de electrones (veáse respiración del fumarato, pág. 358). A continuación el succinato se transforma mediante una *CoA-transferasa* (*succinil-CoA propionato-CoA-transferasa*) en su CoA derivado, y así queda activado. El succinil-CoA se transforma con participación del coenzima B_{12} (cianocobalamina) y a través de la *metil-*

malonil-CoA-mutasa a metilmalonil-CoA. A partir de este producto intermediario ya se libera anhídrido carbónico, formándose propionil-CoA y el enzima antes mencionado, *metilmalonil-CoA-carboxitransferasa*, capta el CO_2. Del propionil-CoA se libera el propionato, por transferencia del CoA al succinato mediante la *CoA-transferasa*. Obsérvese que en este proceso de la formación de propiónico se transfieren dos grupos (CO_2 y CoA) desde un producto posterior a otro anterior en la vía, sin que se liberen estos grupos. También es remarcable la participación de tres cofactores (biotina, CoA, coenzima B_{12}) en este proceso. La mayoría de las propionibacterias sintetizan propionato por la vía del metilmalonil-CoA además de *Veillonella alcalescens* y *Selenomonas ruminantium*.

La vía del metilmalonil-CoA es reversible y puede llevarse a cabo en el sentido inverso, por ejemplo, en la degradación de la valina, la isoleucina y los ácidos grasos de cadena larga con número impar de átomos de carbono. A partir de los ácidos grasos y de la isoleucina se forma propionil-CoA, que se carboxila a metilmalonil-CoA. La transformación hasta succinil-CoA mediante la *metilmalonil-CoA-mutasa* depende de la vitamina B_{12} (coenzima B_{12}) también en el caso de los nódulos radicales en los rizobios y en las células animales.

Vía del acriloil-CoA. La formación de ácido propiónico por *Clostridium propionicum*, *Bacteroides ruminicola* y *Peptostreptococcus elsdenii* tiene lugar por una vía más sencilla. Como producto intermediario se presenta el CoA derivado del ácido acrílico, el acriloil-CoA:



$$\underset{\text{lactil-CoA}}{CH_3-CHOH-CO\text{-}SCoA} \xrightarrow[H_2O]{} \underset{\text{acriloil-CoA}}{CH_2{=}CH-CO\text{-}SCoA} \xrightarrow[2[H]]{} \underset{\text{propionil-CoA}}{CH_3-CH_2-CO\text{-}SCoA}$$

8.4 Fermentación fórmica y Enterobacteriáceas

Algunos organismos fermentadores y formadores de ácidos se incluyen en un grupo fisiológico en el que el ácido fórmico (formiato) no es el producto principal de la fermentación, pero sí es un producto característico. Junto al formiato aparecen otros ácidos como productos de fermentación; este tipo de fermentación se conoce como “fermentación fórmica” o “fermentación ácido-mixta”. Como algunas formas representativas de este grupo son habitantes del intestino (enteron) se reúnen en la familia de las Enterobacteriáceas. Como características de la familia pueden considerarse: bacilos Gram negativos móviles por flagelos de inserción peritrica, no formadores de esporas. Son aeróbicos facultativos, disponen de hemina (citocromo y *catalasa*) y pueden regenerar energía tanto por respiración

Tab. 8.3 Características para la diferenciación de géneros dentro de las Enterobacteriáceas.

Género	Motilidad	Fermentación de la glucosa	Fermentación de la lactosa	Formación de H_2	Formación de indol	Formación de acetoína	Proteolisis	Utilización de urea
Escherichia	+	+	+	+	+	−	−	−
Klebsiella	−	+	+	+	−	+	−	+
Enterobacter	+	+	+	+	−	+	(+)	(+)
Serratia	+	+	−	+	−	+	+	−
Proteus	+	+	−	+	+	−	+	+
Citrobacter	+	+	+	(+)	+	−	−	(+)
Salmonella	+	+	−	+	−	−	−	−
Shigella	−	+	−	−	+	−	−	−
Erwinia	+	+	(+)	−	−	(+)	(+)	−

El símbolo "+" indica que la mayoría de las especies tiene un comportamiento positivo.

(aeróbicos) como por fermentación (anaeróbicos). Con respecto a su alimentación podemos decir que son siempre muy poco exigentes; crecen sobre medios de cultivo sintéticos sencillos que contienen sales minerales, hidratos de carbono y sales de amonio. La fermentación de la glucosa se desarrolla en todos los pertenecientes a este grupo con formación de ácidos. La importancia de las Enterobacteriáceas para la higiene y para la investigación experimental hace necesario que veamos cada uno de los representantes.

Especies importantes. *Escherichia coli* es un habitante intestinal. No es con mucho el más abundante numéricamente, sino que está por detrás de *Bacteroides* y *Bifidobacterium*. No obstante, *E. coli* se mantiene viable un cierto tiempo fuera del intestino y es fácilmente demostrable. Por ello es apropiado utilizarla como demostración de contaminación fecal en las aguas de bebida.

Proteus vulgaris pertenece también a la flora intestinal normal pero asimismo está ampliamente distribuido en el suelo y en las aguas. Esta bacteria es conocida debido a su tendencia a la modificación de forma (nombre), su intensa actividad y la tendencia a diseminarse sobre las superficies de agar y cubrir toda la superficie (pág. 69).

Enterobacter aerogenes es en cierto modo el hermano gemelo de *E. coli*; ambos se designan como "coliformes". Es muy abundante en los suelos. Tal como indica su nombre, esta bacteria forma mucho gas. Se diferencia de *E. coli* tan sólo por unas pocas características bioquímicas (Tab. 8.3 y 8.4).

Serratia marcescens (anteriormente *Bacterium prodigiosum* u "hongo de las hostias") puede ser considerada como una variante pigmentada de *Enterobacter*.

Al género *Erwinia* pertenecen algunas especies patógenas de vegetales, que afectan a los vástagos, las hojas y las raíces y que desencadenan enfermedades debido a la excreción de *pectinasas*.

Klebsiella pneumoniae se diferencia de *Enterobacter* exclusivamente por la formación de una cápsula gruesa y por su falta de motilidad. Se presenta en algunas formas muy peligrosas de inflamación de los pulmones.

Salmonella typhimurium es la bacteria más extendida de entre aquellas que provocan una gastroenteritis, la llamada "intoxicación por productos alimentarios". Esta intoxicación se debe a la liberación de lipopolisacáridos que desencadena una irritación de las mucosas; no se da ninguna invasión del sistema sanguíneo. *S. typhi* es el causante del tifus epidémico. *Shigella dysenteriae* y cepas relacionadas son los causantes de la disentería y las diarreas.

Vibrio cholerae es el causante del cólera, una enfermedad epidémica. Este agente causal no pertenece al grupo de las Enterobacteriáceas, pero desde el punto de vista metabólico y fisiológico es muy próximo. *V. cholerae* se reproduce en el intestino. Se fija sobre el epitelio intestinal, pero no penetra en las células. La enterotoxina del cólera es una proteína, que se fija a las células del epitelio intestinal (unos receptores específicos) y que determina la salida de iones sodio, bicarbonato y cloruro, así como de agua a la luz intestinal.

Yersinia pestis es el causante de la peste. *Yersinia* no pertenece al grupo taxonómico de las Enterobacteriáceas, pero es muy próximo desde el punto de vista de su modo de vida facultativamente anaeróbico y de su tipo de fermentación. El reservorio natural del causante de la peste son los roedores salvajes, sobre todo ratas. Las bacterias son transmitidas por pulgas infectadas o por otros ectoparásitos hasta el hombre y conducen a la peste bubónica o a la peste pulmonar. Mediante una multiplicación rápida y la producción de una fuerte toxina conducen rápidamente a la muerte.

Análisis de las aguas potables. El análisis de las aguas potables se centra esencialmente en la demostración de la presencia de *Escherichia coli* y lo trataremos con detalle como un ejemplo sencillo de un diagnóstico bacteriológico diferencial.

E. coli es un habitante totalmente inocuo del intestino humano; su presencia en las aguas potables no es peligrosa, aunque algunas cepas son enteropatógenas y determinan enfermedades de tipo diarreico. No obstante, en el intestino habitan una serie de causantes de enfermedades, que son eliminados con los excrementos de enfermos agudos, de convalecientes o de "portadores", de forma que llegan conjuntamente con *E. coli* a las aguas potables. Para no tener que desarrollar métodos especiales para cada uno de los causantes de una enfermedad se utiliza como indicador la bacteria intestinal normal *E. coli*. La demostración de la presencia de *E. coli* en una muestra de agua indica la contaminación por contenido de bacterias intestinales entre las que pueden encontrarse organismos patógenos, por lo que hay que tomar precauciones. El número total de organismos en las aguas potables debe encontrarse por debajo de las cien células por mililitro. En 100 mililitros de agua potable no debe poder demostrarse la presencia de *E. coli*.

E. coli crece bien sobre medios de cultivo que contengan glucosa, o lactosa y peptona. Para establecer ya desde un principio condiciones selectivas para que puedan crecer pocas bacterias, se utiliza la **lactosa**. La utilización de lactosa supone la capacidad de escindir la lactosa mediante la *β-galactosidasa*; este enzima lo pueden sintetizar las bacterias coliformes y las bacterias lácticas, pero no otras muchas bacterias de los suelos y las aguas.

Una primera indicación de que se trata de bacterias formadoras de gas la da ya la producción durante la incubación de las muestras en un medio de cultivo que contiene lactosa y peptona en tubos de fermentación (tubos de Einhorn). Si se incuba uno de los frascos con *Escherichia coli*, y los otros con *Enterobacter aerogenes* pueden ya determinarse diferencias en la producción de gas al cabo de tan sólo 24 h de incubación a 37°C. *E. aerogenes* hace honor a su nombre y produce aproximadamente doble cantidad de gas que *E. coli*. Este último forma hidrógeno y anhídrido carbónico aproximadamente en la relación 1:1; *Enterobacter aerogenes* forma más anhídrido carbónico que hidrógeno.

Como algunas bacterias del ácido láctico son capaces de desdoblar la lactosa formando gas, por lo que podrían falsear los resultados, son necesarios otros procedimientos para la diferenciación. Si se siembran en placa organismos de un cultivo de este tipo sobre agar-eosina-azul de metileno (lactosa-peptona-eosina-azul de metileno) las colonias de *E. coli* se diferencian porque sus colonias son de tonalidad negra con un brillo metálico acentuado por la reflexión de la luz; *Enterobacter* forma únicamente colonias rosa limosas y sin el brillo metálico.

Para una diferenciación aún más exacta de las dos especies podría desarrollarse un análisis completo de la fermentación; ésta sería sin ninguna duda la vía más exacta, pero también la más complicada. Para la diferenciación total se ha acostumbrado a seguir un método rutinario (Tab. 8.4). Las dos especies se diferencian entre sí cualitativamente por: 1. la **formación de indol** a partir de triptófano, 2. la cantidad de ácido formado a partir de azúcar (**prueba del rojo de metilo**), 3. la **formación de acetoína** durante la fermentación de la glucosa (**reacción de**

Voges-Proskauer), y 4. el crecimiento sobre **citrato** como fuente de carbono. Estas reacciones, denominadas con fines mnemotécnicos como "**IMViC**", se representan en la tabla 8.4.

1. **Formación de indol**: el indol formado a partir del triptófano se muestra mediante el reactivo de EHRLICH (p-dimetilaminobenzaldehído) que da una tonalidad rojo cereza.
2. **Prueba del rojo de metilo**: la formación de ácidos conduce al viraje del indicador de pH rojo de metilo: rojo < pH 4,5 < amarillo.
3. **Formación de acetoína (reacción de Voges-Proskauer)**: en un medio de cultivo con glucosa y peptona la acetoína formada conduce junto a la creatina contenida en la peptona y después de añadir un álcali fuerte (1 ml de KOH al 10% en 5 ml de cultivo) a una coloración roja. Puede incrementarse la sensibilidad añadiendo creatina y α-naftol.
4. **Utilización del citrato**: la utilización del citrato en un medio de cultivo sintético con citrato se demuestra por la aparición de turbidez y alcalinización (azul de bromotimol).

Tab. 8.4 Reacciones del IMViC para diferenciar *Escherichia coli* y *Enterobacter aerogenes*.

	Formación de indol	Prueba del rojo de metilo	Formación de acetoína	Citrato
Escherichia coli	+	+	–	–
Enterobacter aerogenes	–	–	+	+

Productos de fermentación y vías metabólicas. Las fermentaciones de las bacterias aeróbicas facultativas, incluyendo las Enterobacteriáceas, muchas especies de *Bacillus* y otras especies de bacterias conlleva la formación de una gran cantidad de compuestos, entre los que predominan los ácidos orgánicos; los principales productos de fermentación son acetato, formiato, succinato, lactato, etanol, glicerina, acetoína, 2,3-butanodiol, anhídrido carbónico e hidrógeno molecular. Las hexosas se degradan preferentemente por la vía de la fructosa-bifosfato y tan sólo una pequeña cantidad a través de la vía de la pentosafosfato. La utilización del gluconato sigue la vía del 2-ceto-3-desoxi-6-fosfogluconato.

Con relación a los productos de fermentación excretados en condiciones anaeróbicas pueden establecerse dos tipos: a) tipo *Escherichia coli*: se producen preferentemente ácidos pero no butanodiol; b) tipo *Enterobacter*: además del producto principal butanodiol se producen en cantidades secundarias ácidos. La tabla 8.6 da los resultados de un análisis de fermentación representativo. Los dos tipos de fermentación se diferencian sobre todo por las reacciones que parten del piruvato.

Tabla 8.5 Productos de la fermentación de la glucosa por *Escherichia coli* y *Enterobacter aerogenes*.

Productos		moles por 100 moles de glucosa *E. coli*	 *E. aerogenes*
2,3-butanodiol	$CH_3-CHOH-CHOH-CH_3$	0	66,5
Etanol	CH_3-CH_2OH	42	70
Succinato	$COOH-CH_2-CH_2-COOH$	29	0
Lactato	$CH_3-CHOH-COOH$	84	3
Acetato	CH_3-COOH	44	0,5
Formiato	$HCOOH$	2	18
Hidrógeno	H_2	43	36
Anhídrido carbónico	CO_2	44	172

De THIMANN, K.V.: The Life of Bacteria, Macmillan, New York 1955.

Características de la fermentación de *Escherichia coli*. La fermentación de la glucosa por *Escherichia coli* se caracteriza por las siguientes reacciones: (1) escisión del piruvato en acetil-CoA y formiato; (2) escisión del formiato en anhídrido carbónico e hidrógeno; (3) reducción del acetil-CoA hasta etanol y (4) incapacidad de formar acetoína y 2,3-butanodiol a partir del piruvato.

La **escisión del piruvato** en acetil-CoA y formiato tiene lugar únicamente bajo condiciones anaeróbicas. Está catalizada por la *piruvato-formiato-liasa* (véase la oxidación del piruvato, pág. 254). Este enzima es extraordinariamente sensible al oxígeno y se mantiene en estado reducido por la flavodoxina y para su activación requiere S-adenosil-L-metionina.

El **formiato** es escindido por la mayoría de las cepas de *E. coli* y otras especies formadoras de gas entre las Enterobacteriáceas, en anhídrido carbónico e hidrógeno:

$$HCOOH \xrightarrow{\textit{hidrógeno-liasa fórmica}} H_2 + CO_2$$

La reacción está catalizada por un sistema enzimático, que se ha denominado *hidrógeno-liasa fórmica*. Se trata con mucha probabilidad de la acción combinada de una *formiato-deshidrogenasa* ($HCOOH + X \rightarrow CO_2 + XH_2$) y de una *hidrogenasa* ($XH_2 \rightarrow X + H_2$). En *E. coli* los productos gaseosos H_2 y CO_2 se producen prácticamente en cantidades iguales. Esta relación estequiométrica de 1:1 está de acuerdo con la formación de ambos gases por la escisión del formiato. La variación del valor de pH conduce, no obstante, a un desplazamiento en las relaciones cuantitativas.

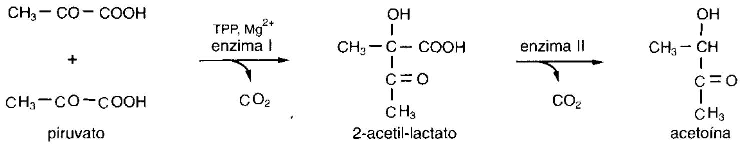
El **etanol** representa en las Enterobacteriáceas un producto de reducción del acetil-CoA; la *piruvato-descarboxilasa*, que descarboxila al piruvato hasta acetaldehído, no está en ellas. Una parte del acetil-CoA producido se excreta como acetato; el enlace rico en energía se conserva en las reacciones de la *fosfotransacetilasa* y la *acetato-quinasa*.

El **lactato** se forma por reducción del piruvato.

El **succinato** es el producto de un proceso acoplado a una fosforilación en el transporte de electrones, "respiración del fumarato" (pág. 358). Primero se forma oxalacetato por carboxilación del fosfoenolpiruvato y se transforma a fumarato a través del malato. El fumarato se reduce a succinato por acción de una *fumarato-reductasa* ligada a membranas y como tal es excretado. La excreción de gran cantidad de succinato (Tab. 8.5), cuya síntesis implica una fijación de CO_2, explica también el hecho de que *Escherichia coli* pueda obtener hasta un 20% de su carbono celular a partir del CO_2.

Características de la fermentación de *Enterobacter aerogenes*. *Enterobacter aerogenes* produce en condiciones anaeróbicas igualmente varios ácidos. No obstante, cuantitativamente son siempre inferiores a la **acetoína** y al **2,3-butanodiol**. La formación de acetoína parte de dos moléculas de piruvato e incluye una doble descarboxilación. La formación del producto de fermentación neutro butanodiol compite, por tanto, en cierto modo con el producto intermediario piruvato, y disminuye así la producción de ácido. Por otra parte, en la formación de butanodiol tiene lugar una producción adicional de anhídrido carbónico. La cantidad adicional de anhídrido carbónico producido está en relación estequiométrica con la cantidad de butanodiol. De la tabla 8.5 puede deducirse que una parte del anhídrido carbónico procede de la escisión del formiato, pero la cantidad predominante de la formación de butanodiol. A la elevada producción de gas debe *E. aerogenes* su nombre. Las diferencias en cuanto a la fermentación con respecto a *Escherichia coli* son la base de la prueba del rojo de metilo y la acetoína para la reacción de Voges-Proskauer.

La **formación de acetoína** por *Enterobacter* discurre a través del 2-acetil-lactato. El acetaldehído activo (hidroxietil-tiaminapirofosfato; Fig. 7.6) reacciona con el piruvato en una reacción catalizada por la *acetil-lactato-sintetasa* (enzima I) formándose 2-acetil-lactato:



Un segundo enzima (II), la *2-acetil-lactato-descarboxilasa*, libera anhídrido carbónico (estereoespecíficamente). El producto de esta transformación es la acetoína (= acetil-metil-carbinol).

El **2,3-butanodiol** se forma por reducción de la acetoína mediante la *butanodiol-deshidrogenasa*:

$$CH_3\text{–CHOH–CO–}CH_3 + NADH_2 \longrightarrow CH_3\text{–CHOH–CHOH–}CH_3 + NAD$$

Enterobacter aerogenes, *Bacillus subtilis*, *Bacillus polymyxa*, *Serratia*, *Aeromonas hydrophyla* y otras especies de bacterias forman butanodiol a través del 2-acetil-lactato como producto intermediario. Las fermentaciones del butanodiol han tenido también históricamente distintas utilizaciones industriales.

El compuesto **diacetilo**, semejante a la acetoína, se forma fácilmente por oxidación de esta última en el aire. Existen también diversas bacterias del ácido láctico que son capaces de formar diacetilo (*Leuconostoc cremoris*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactococcus lactis* var. *diacetilactis*, y en menor proporción también *Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus*) que se añaden a la leche en la elaboración de productos alimentarios a base de leche agria (como la mantequilla o el yogur) únicamente con el fin de producir diacetilo. El diacetilo es un compuesto aromático responsable del aroma de la mantequilla. Las bacterias citadas no lo sintetizan a través del 2-acetil-lactato, sino a través del hidroxietil-tiaminapirofosfato y del acetil-CoA.

Bacterias luminiscentes y bioluminiscencia

La bioluminiscencia es la capacidad de emitir luz y está ampliamente distribuida. De entre los organismos con esta capacidad uno de los más conocidos en Europa es el coleóptero luminoso endémico *Lampyris noctiluca* y en USA la luciérnaga *Photinus pyralis* ("fire fly"). También algunos coleópteros, cangrejos, helmintos, hongos (*Armillaria mellea*, *Panus stipticus*), protozoos (dinoflagelados) y los órganos luminosos de peces.

Las **bacterias luminiscentes** que aquí nos interesan son microorganismos marinos. Se trata de bacterias quimioorganotrofas muy semejantes a las enterobacterias desde el punto de vista de sus características morfológicas y fisiológicas. Por ello se las llama también "enterobacterias marinas". Algunas de estas bacterias se mantienen en simbiosis en órganos de iluminación de peces en profundidad y en cefalópodos. Mientras que en los peces y otros animales resulta comprensible que la luz dé una cierta ventaja selectiva, la significación biológica de la bioluminiscencia para los unicelulares no ha podido ser explicada todavía.

Las bacterias luminiscentes se pueden aislar fácilmente a partir del agua de mar o de aguas salobres. Se desarrollan sobre la carne y el pescado como sustratos de enriquecimiento naturales, preferentemente a temperaturas bajas. Si se deja un pez de mar en un cuenco con agua marina de forma que quede semicubierto y en la nevera (4-6°C), se desarrollarán en su superficie colonias de bacterias luminosas, que pueden aislarse y obtenerse en cultivo puro. Por lo general no son putrefactoras; a pesar de que liberen aminas, no producen ninguna sustancia tóxica. "Algún trozo de carne puede haber sido luminiscente por la noche, antes de haber sido transformado al día siguiente en un exquisito y sabroso alimento" (R. BOYLE, 1667).

Bacterias luminiscentes. Todas las bacterias luminiscentes que han sido aisladas hasta la actualidad son Gram negativas, anaeróbicas facultativas y móviles mediante flagelos. Debido a su flagelación (polar o peritrica, de 1 a 8 flagelos sencillos o con vaina) se ordenan en los géneros *Photobacterium* y *Vibrio*. Las especies más conocidas y estudiadas pertenecen a *Photobacterium phosphoreum*, *Vibrio fischeri*, *Vibrio harveyi* y *Vibrio logei*. Bajo condiciones anaeróbicas la mayoría de las bacterias luminiscentes realizan una fermentación fórmica o una fermentación ácido-mixta, tal como lo conocemos de las Enterobacteriáceas, produciendo distintos compuestos: formiato, acetato, lactato, succinato, alcohol, anhídrido carbónico y acetoína. Al igual que otras muchas bacterias marinas son halófilas; si se transfieren a una disolución hipotónica (agua destilada) se lisan inmediatamente.

Tanto el crecimiento como la bioluminiscencia de los organismos están muy influenciados por la composición del medio de cultivo en el que se encuentran. La luminosidad únicamente tiene lugar en presencia de oxígeno; por ello se utilizaron las bacterias luminiscentes ya en el cambio de siglo como indicadores muy sensibles para la demostración de la producción de oxígeno en la fotosíntesis por algas verdes y rojas iluminadas con luz de distinto color.

Proceso de la luminiscencia. El proceso de la luminiscencia hay que considerarlo como un proceso de oxidación aeróbica, paralelo al de la respiración, pero no conduce a la producción de ATP, sino a la excitación de un compuesto intermediario, que emite luz. El proceso luminiscente se formuló por primera vez gracias a las investigaciones realizadas con extractos de agua caliente (luciferina) y extractos con agua fría (*luciferasa*) de los órganos luminosos del molusco de la especie *Pholas dactylus* (DUBOIS, 1885).

$$\text{luciferina} \xrightarrow[O_2]{\textit{luciferasa}} \text{luz}$$

Proceso luminiscente en animales. Las sustancias implicadas en la bioluminiscencia se diferencian por distintos sistemas. Donde está más avanzada la investigación es en *Photinus pyralis*, la luciérnaga americana. La luciferina de este sistema luminiscente se identificó como un derivado del benzotiazol. En la *luciferasa* (E) tiene lugar la transformación de la luciferina reducida (LH_2) que se transforma catalíticamente con el ATP a un adenilato, que conduce a la formación de luz por oxidación:

$$LH_2 + ATP + E \rightleftharpoons E{\cdot}LH_2{-}AMP + PP_i$$

$$E{\cdot}LH_2{-}AMP + O_2 \longrightarrow \text{luz} + \text{producto}$$

Las relaciones estequiométricas entre el ATP y la intensidad de luz ha hecho de la "fire fly-luminiscence" un test muy apreciado para la determinación cuantitativa del ATP.

Proceso luminiscente bacteriano. En el proceso luminiscente bacteriano están implicados igualmente varios componentes: FMN reducido, oxígeno y un aldehído de cadena larga (tetradecanal). La *luciferasa* es una *mono-oxigenasa* (pág. 475 y sig.). La reacción puede formularse de la siguiente manera:

$$FMNH_2 + O_2 + R{-}CHO \longrightarrow FMN + H_2O + R{-}COOH + h\nu$$

La oxidación del $FMNH_2$ conduce probablemente en primer lugar a un FMN excitado, esto es $(FMN{\cdot}H_2O)^*$; éste pasa luego al estado no excitado por emisión de luz:

$$(FMN{\cdot}H_2O)^* \xrightarrow{h\nu} FMN{\cdot}H_2O \longrightarrow FMN + H_2O$$

Autoinducción de la luminosidad. *Vibrio fischeri* puede aislarse tanto de agua marina como de los órganos luminosos de peces marinos, en los que la bacteria vive como ectosimbionte. Mientras que los cultivos con densidades celulares bajas no son luminosos o sólo muy poco, las suspensiones densas producen una luz muy superior a lo que correspondería proporcionalmente. Este fenómeno se debe a la inducibilidad de la iluminación. El inductor lo forman las propias células durante el crecimiento. Por ello se le denomina un **autoinductor**. Se trata de una sustancia de bajo peso molecular de estructura conocida. Se encuentra en el citoplasma y en el medio de suspensión aproximadamente en la misma concentración. Por ello, la concentración del autoinductor es elevada cuando también lo son las densidades celulares. Es la señal química para la expresión de los genes de la luminiscencia y de la formación de la *luciferasa*. El sistema de regulación se ha aclarado en sus detalles y explica por qué las bacterias luminiscentes del agua de mar no producen luz, pero sí en los órganos luminosos (con 10^{10} células/ml).

Los genes de la bioluminiscencia se pueden transferir en forma de plásmidos híbridos a otras bacterias y también a vegetales (tabaco). Allí también se expresan. En la ingeniería genética se emplea el sistema luminiscente como marcador de genes y como indicador.

8.5 Fermentación butirato-butanol por clostridios

El butirato, el butanol, la acetona, el 2-propanol y otros ácidos orgánicos y alcoholes son productos típicos de la fermentación de los hidratos de carbono por esporulados anaeróbicos (clostridios). El grupo de los clostridios, entre ellos algunos especialistas capaces de fermentar el etanol, los aminoácidos y otras sustancias se estudiarán por ello en relación con la fermentación butírica.

Características. El género *Clostridium* pertenece a la familia de las Baciláceas. Al igual que otros miembros pertenecientes a esta familia (*Bacillus*, *Sporolactobacillus*, *Desulfotomaculum* y *Sporosarcina*) los clostridios son Gram positivos. Los clostridios son móviles por flagelos dispuestos peritricamente. Las células vegetativas son bacilares; su aspecto, no obstante, es variable y viene determinado por las condiciones ambientales. Las endósporas son de forma oval o esférica y deforman el aspecto bacilar de la célula madre, ya que su diámetro por lo general es mayor que el del esporangio. Las esporas son termorresistentes.

Los clostridios se caracterizan fisiológicamente por su **acusado metabolismo fermentativo** y por sus relaciones con el oxígeno. Sólo crecen bajo **condiciones anaeróbicas**. No obstante, parecen darse todas aquellas transiciones entre las especies anaeróbicas estrictas (*Clostridium pasteurianum*, *C. kluyveri*) hasta las especies prácticamente aerotolerantes (*C. histolyticum*, *C. acetobutylicum*). Por lo general los clostridios no contienen ningún derivado con grupo hemo (citocromo, *catalasa*). Algunas especies son sin embargo capaces de formar citocromos cuando se añaden los precursores al medio de cultivo. Como sustancias de reserva están muy extendidos los polisacáridos del tipo del almidón.

La temperatura óptima para el crecimiento de la mayoría de los clostridios conocidos se encuentra entre los 30 y los 40°C. Junto a estos representantes mesófilos se encuentran también entre los clostridios muchas especies termófilas, cuyo óptimo de temperatura se encuentra entre los 60 y los 75°C: *Clostridium thermoaceticum*, *Clostridium thermohydrosulfuricum*. Como las otras Baciláceas, los clostridios sólo pueden crecer a pH neutros (o alcalinos). Su crecimiento, muchas veces indeseable, puede impedirse por tanto totalmente mediante acidificación (col fermentada, ensilado, conservas de frutas, embutidos crudos).

Sustratos de los clostridios. Los clostridios se diferencian ampliamente en cuanto a los nutrientes que pueden utilizar y fermentar. Algunos clostridios son poco exigentes y tienen un espectro de sustratos muy amplio, mientras que otros son considerados como especialistas y únicamente capaces de utilizar uno o pocos sustratos.

En conjunto los clostridios tienen a su disposición un amplio espectro de sustancias naturales utilizables como sustratos; pueden descomponer polisacáridos (como por ejemplo almidón, glucógeno, celulosa, hemicelulosa, pectina), ácidos nucleicos, proteínas, aminoácidos, purinas y pirimidinas. Algunos clostridios requieren medios nutritivos complejos o requerimientos específicos, mientras que otros no los precisan. Algunos son capaces de desarrollarse con nitrógeno molecular como única fuente de nitrógeno, fijándolo a tasas muy elevadas (como *Clostridium pasteurianum*).

Desde el punto de vista de la utilización de los sustratos pueden agruparse los clostridios en dos grupos: los **clostridios sacarolíticos** degradan preferentemente polisacáridos o azúcares, y los **clostridios peptolíticos** degradan proteínas, peptonas y aminoácidos. Además se establecen grupos en base a las características de la fermentación y a los productos de fermentación (Tab. 8.6 y 8.7).

Aislamiento y enriquecimiento. Para el enriquecimiento específico de los clostridios pueden utilizarse algunas características generales. Ya que las esporas son termorresistentes, se utiliza un inóculo pasteurizado. Empleando condiciones anaeróbicas estrictas se evita la presencia de todos los aeróbicos.

Como algunas bacterias degradadoras de los polisacáridos se encuentran fijadas a la superficie de partículas, por ejemplo de gránulos de almidón o de partículas de celulosa en la panza o en los sedimentos, pueden lavarse inicialmente estas partículas, de modo que se liberen de otras bacterias para utilizarlas luego como inóculo. Para mantener una elevada capacidad de fermentación debe también trabajarse siempre con inóculos pasteurizados al seguir estudiando la cepa aislada.

Productos de fermentación y bioquímica de la fermentación. Durante la fermentación se forman cantidades variables de ácidos (butirato, acetato, lactato), alcoholes (butanol, etanol, 2-propanol) así como acetona y gas (hidrógeno y anhídrido carbónico). Los clostridios degradan la glucosa a través de la vía de la fructosa-bifosfato. El hidrógeno liberado en el curso de la deshidrogenación del gliceraldehídofosfato se transfiere, por lo general, a ácidos orgánicos o a cetonas, que se sintetizan a partir del piruvato o bien del acetil-CoA. Como prototipo de las fermentaciones por los clostridios hay que considerar la de la glucosa por

Clostridium butyricum y *C. acetobutylicum*. Como productos de fermentación aparecen también butirato, acetato, butanol, etanol, acetona, 2-propanol, anhídrido carbónico e hidrógeno. Las cantidades de productos de fermentación son variables y dependen de las condiciones ambientales.

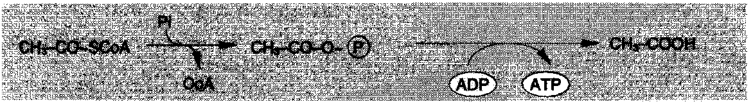
Tab. 8.6 Visión de conjunto de los clostridios, ordenados según sus características fermentativas.

Especies de *Clostridium*	Sustrato	Productos de fermentación
I. **Producción de ácido butírico**		
C. butyricum	Glucosa; almidón; dextrina	Butirato; acetato; CO_2; H_2
C. tyrobutyricum	Glucosa o lactato (glicerina) + acetato	Butirato; acetato; CO_2; H_2
C. pasteurianum	Glucosa; almidón; manitol; inulina	Butirato; acetato; CO_2
C. pectinovorum	Pectina; almidón; glucógeno; dextrina	Butirato; acetato
II. **Producción de butanol**		
C. butylicum	Glucosa	Butirato; acetato; butanol; 2-propanol; CO_2; H_2
C. acetobutylicum	Glucosa; glicerina; piruvato	Butirato; acetato; butanol; acetona; acetoína; etanol; CO_2; H_2
III. **Producción de ácido propiónico**		
C. propionicum	Alanina; treonina	Acetato; propionato; CO_2
IV. **Producción de ácido caproico**		
C. kluyveri	Etanol + acetato + CO_2	Caproato; butirato; H_2
V. **Reacción de Stickland positiva**		
C. botulinum	Proteínas; aminoácidos	Acetato; lactato; NH_3; H_2
C. histolyticum		
C. sporogenes		
C. sticklandli		
VI. **Presencia de vías metabólicas especiales**		
C. aceticum	(CO_2 + H_2); fructosa	Acetato
C. tetanomorphum	Glutamato; histidina	Butirato; acetato; NH_3; CO_2; H_2
C. acidi-urici	Ácido úrico; xantina	Acetato; formiato; CO_2; NH_3

Tab. 8.7 Fermentaciones especiales.

Especie	Sustrato	Productos de fermentación
Eubacterium limosum (*Butyribacterium rettgeri*)	glucosa; lactato piruvato	butirato; acetato; CO_2; H_2 lactato (con glucosa)
Peptococcus anaerobius (*Diplococcus glycinophilus*)	glicina	acetato; CO_2; H_2; NH_3
Fusobacterium nucleatum	aminoácidos	acetato; lactato; etanol CO_2; NH_3
Clostridium oroticum	ácido orótico	acetato; succinato; CO_2; NH_3

El **butirato** es el producto de la condensación de dos moléculas de acetil-CoA mediante el enzima *tiolasa* hasta acetil-CoA y su producto de reducción (Fig. 8.4). El acetil-CoA se reduce a ß-hidroxibutiril-CoA con el $NADH_2$ mediante la *ß-hidroxibutiril-CoA-deshidrogenasa.* A partir de aquí se elimina agua mediante una *crotonasa.* El crotonil-CoA es reducido por una *butiril-CoA-deshidrogenasa,* un enzima flavínico, hasta butiril-CoA. A partir del butiril-CoA puede transferirse el CoA, mediante una *CoA-transferasa,* hasta acetato, liberándose entonces butirato; éste es secretado. A partir del acetil-CoA y por la *fosfotransacetilasa* y la *acetato-quinasa* puede regenerarse el ATP con formación de acetato (véase también pág. 293).



En la fermentación butírica pura se libera de forma gaseosa el hidrógeno producto de la oxidación del piruvato. Cuando la glucosa se fermenta a butirato, anhídrido carbónico e hidrógeno, el balance de hidrógenos está equilibrado y entonces se consiguen 3 moles de ATP por mol de glucosa.

$$\text{glucosa} \longrightarrow \text{butirato} + 2\,CO_2 + 2\,H_2$$

El **butanol**, el **butirato**, la **acetona** y el **2-propanol** son los productos de la fermentación de la glucosa por *Clostridium acetobutylicum.* En esta fermentación se excreta igualmente ácido butírico en primer lugar. Al aumentar la acidificación (Fig. 8.5) aumenta, no obstante, la formación de enzimas, entre ellos la *acetato-descarboxilasa,* cuya función conduce al acúmulo de **acetona** y **butanol**. Entre la formación de acetona y de butanol existe una estrecha relación. Con la descarboxilación de una parte del acetoacetato se pierde un aceptor de hidrógenos potencial, que en la reducción hasta butirato hubiera captado dos veces 2[H]. Este hidrógeno ha de pasar ineludiblemente a otros aceptores de hidrógeno, entre ellos también al buti-

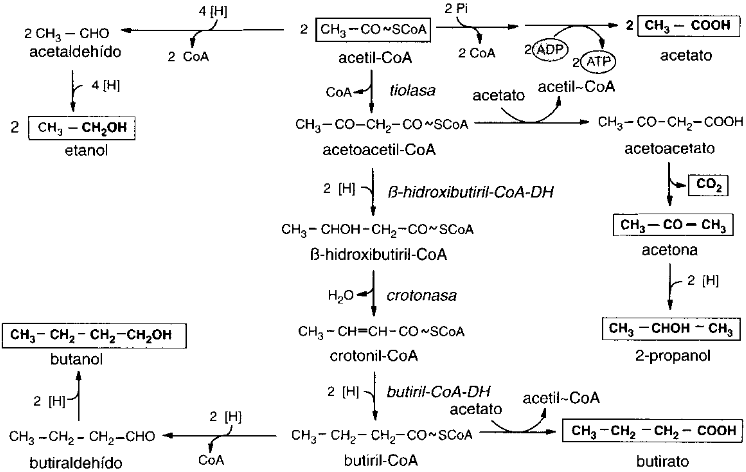

2 CH3 – CHO
acetaldehído
4 [H]
2 CoA
4 [H]
2 CH3 – CH2OH
etanol
2 CH3–CO~SCoA
acetil-CoA
2 Pi
2 CoA
2 ADP
2 ATP
2 CH3 – COOH
acetato
CoA
tiolasa
acetato
acetil-CoA
CH3–CO–CH2–CO~SCoA
acetoacetil-CoA
CH3–CO–CH2–COOH
acetoacetato
CO2
CH3 – CO – CH3
acetona
2 [H]
ß-hidroxibutiril-CoA-DH
CH3–CHOH–CH2–CO~SCoA
ß-hidroxibutiril-CoA
2 [H]
CH3 – CHOH – CH3
2-propanol
H2O
crotonasa
CH3–CH=CH–CO~SCoA
crotonil-CoA
CH3– CH2– CH2–CH2OH
butanol
2 [H]
2 [H]
butiril-CoA-DH
acetato
acetil-CoA
CH3 –CH2– CH2–CHO
butiraldehído
2 [H]
CoA
CH3– CH2– CH2–CO~SCoA
butiril-CoA
CH3 –CH2 – CH2 – COOH
butirato

Fig. 8.4 Formación de acetato, etanol, n-butanol, butirato, acetona y 2-propanol en las fermentaciones de los clostridios. La degradación de la glucosa sigue la vía de la fructosa-bifosfato; el piruvato es transformado por la *piruvato: ferredoxina-oxidorreductasa*. Sólo se representan las reacciones que parten del acetil-CoA.

rato ya excretado. En la reducción hasta butanol debe activarse en primer lugar al butirato por formación de butiril-CoA. En el esquema (Fig. 8.4) se han resumido las transformaciones implicadas en la formación de butirato y acetona-butanol. Durante una fermentación alcalina (por ejemplo en presencia de $CaCO_3$; véase Tab. 8.8) *C. acetobutylicum* se comporta como *C. butyricum*. Algunas cepas reducen la acetona y excretan 2-propanol.

El **etanol** se forma por reducción del acetil-CoA.

El **hidrógeno molecular** puede proceder tanto de la escisión del piruvato como de la molécula de $NADH_2$ procedente de la deshidrogenación del gliceraldehídofosfato (véase pág. 295). Cuanto más hidrógeno se libere, habrá que sintetizar menos aceptores de hidrógeno (acetoacetil-CoA). El enlace rico en energía del acetil-CoA puede por tanto conservarse en forma de ATP. Si en la fermentación de la glucosa por *C. butyricum* se forman más de dos moles de H_2, y por tanto menos butirato y una cantidad correspondiente de acetato, el rendimiento energético puede sobrepasar los tres ATP (véase *Ruminococcus*, pág. 331).

La producción de acetona, de 2-propanol y de butanol ha adquirido importancia industrial; estos productos de fermentación se utilizan como disol-

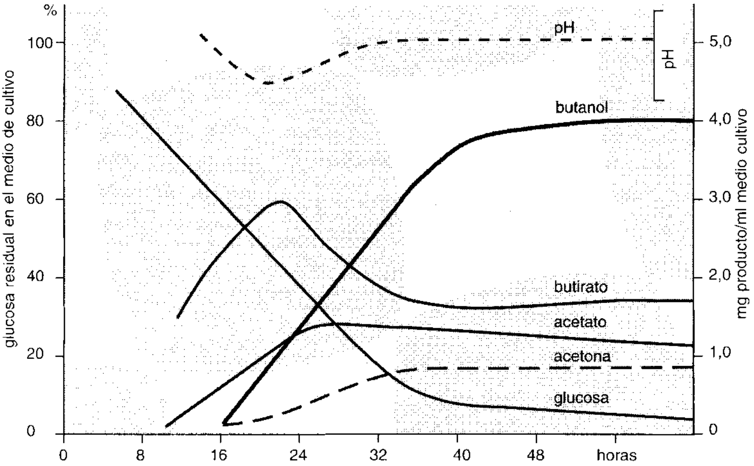


Fig. 8.5 Representación a lo largo del tiempo de la fermentación de la glucosa por *Clostridium acetobutylicum* (según Davies, R., M. Stephenson: Biochem. J. 35 [1941] 1320).

ventes orgánicos. Las fermentaciones de los clostridios fueron las primeras que plantearon a la industria la necesidad de realizar transformaciones microbianas en ausencia de cualquier tipo de contaminación.

Fermentación de etanol y acetato. A partir de un cultivo de enriquecimiento de *Methanobacterium omelianskii* con etanol como sustrato, se aisló un esporulado anaeróbico, que además de etanol requiere acetato. Esta bacteria *Clostridium kluyveri* transforma el etanol y el acetato a buti-

Tab. 8.8 Fermentación acetona-butanol en *C. acetobutylicum* en presencia y en ausencia de $CaCO_3$.

Productos de la fermentación	sin $CaCO_3$	con $CaCO_3$
Butirato	32,4*	630
Butanol	411,5	45,7
Acetato	102,1	230,7
Etanol	44,5	22,4
Acetona	222,3	13,2

* en mg de producto en relación a cada 50 ml de harina de trigo al 6% fermentados (de Bernhauer et al. Biochem. Zeitschrift, 287 [1936] 61).

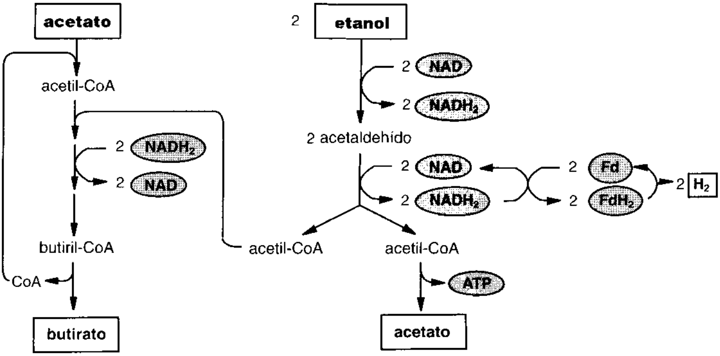


Fig. 8.6 Fermentación de etanol y acetato hasta butirato e hidrógeno por *Clostridium kluyveri*.

rato, capronato y H_2 (Fig. 8.6). El acetato actúa como un aceptor adicional de hidrógenos, pero se forma en el curso de la fermentación. El ATP únicamente se regenera en la reacción de la *acetato-quinasa*.

Fermentación de lactato y acetato. *Clostridium tyrobutyricum* se aisló de un cultivo de enriquecimiento que contenía lactato como sustrato. Éste también requiere acetato como aceptor adicional de hidrógenos, y esto cuando el lactato o la glicerina actúan como sustrato principal:

$$CH_3\text{–}CHOH\text{–}COOH + CH_3\text{–}COOH \rightarrow CH_3\text{–}CH_2\text{–}CH_2\text{–}COOH + H_2O + CO_2$$

La fermentación de la glucosa por *C. tyrobutyricum* sigue el esquema ya conocido de *C. butyricum* y no requiere ningún aceptor adicional de hidrógenos.

Fermentación de ácido glutámico. De la gran cantidad de procesos de fermentación en los que se transforman aminoácidos en condiciones anaeróbicas hasta ácidos grasos, anhídrido carbónico y amonio, trataremos aquí únicamente la degradación del glutamato por *Clostridium tetanomorphum*. Esta fermentación llamo la atención, porque en ella se reconoció la función bioquímica de la vitamina B_{12}, considerada hasta entonces únicamente como vitamina. *C. tetanomorphum* procede de un cultivo de enriquecimiento con histidina como sustrato. Esta última se degrada a través del glutamato. Como producto de la fermentación del glutamato aparecen butirato, acetato, amonio, anhídrido carbónico e hidrógeno molecular. La degradación del glutamato implica una serie de reacciones poco usuales (Fig. 8.7). Se inicia con la rotura del enlace entre los carbonos 2 y 3 y la unión de los átomos de carbono 2 y 4, formándose el aminoácido

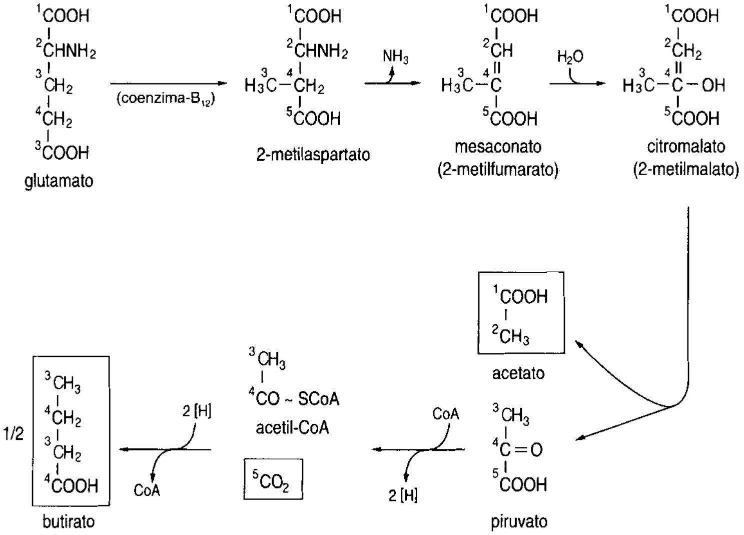

glutamato
(coenzima-B12)
2-metilaspartato
NH3
mesaconato
(2-metilfumarato)
H2O
citromalato
(2-metilmalato)
acetato
piruvato
CoA
2 [H]
acetil-CoA
5CO2
1/2
butirato

Fig. 8.7 Fermentación de glutamato por *Clostridium tetanomorphum* a través de la vía del mesaconato.

ramificado metilasparagina. A partir de aquí participa el coenzima vitamina B_{12}. A este nivel tiene lugar la desaminación. Al mesaconato insaturado (metilfumarato) se añade una cierta cantidad de agua. El citramalato (2-metilmalato) se escinde entonces en acetato y piruvato. El acetato es secretado y el piruvato se transforma en butirato y CO_2 a través de la vía ya conocida.

Fermentación de parejas de aminoácidos: reacción de Stickland. Los clostridios peptolíticos (Tab. 8.6, V) hidrolizan proteínas y fermentan aminoácidos. Muchos aminoácidos no son transformados de forma aislada. Tal como descubrió STICKLAND (1934) una mezcla de alanina y glicina es fermentada rápidamente por *Clostridium sporogenes*, aunque los aminoácidos aislados no sean transformados. En base a la ecuación de equilibrio

$$\text{alanina} + 2\ \text{glicina} + 2\ H_2O \longrightarrow 3\ \text{acetato} + 3\ NH_3 + CO_2$$

parece que la alanina actúa como dador de hidrógenos y la glicina como aceptor de hidrógenos.

$$CH_3\text{–}CHNH_2\text{–}COOH + 2\ H_2O \longrightarrow CH_3\text{–}COOH + NH_3 + CO_2 + 4\ [H]$$

$$2\ CH_2NH_2\text{–}COOH + 4\ [H] \longrightarrow 2\ CH_3\text{–}COOH + 2\ NH_3$$

Aparentemente la energía se obtiene por una **reacción acoplada de oxidación-reducción**. Como dadores de hidrógeno actúan, por ejemplo, alanina, leucina, isoleucina, valina, serina, metionina, entre otros. Como aceptores de hidrógeno pueden actuar glicina, prolina, arginina y triptófano, entre otros. El aminoácido dador se desamina a un oxoácido, que posteriormente mediante una descarboxilación oxidativa se transforma en el ácido graso. Este paso va unido a una fosforilación y representa por tanto la reacción productora de energía. El hidrógeno transferido a la ferredoxina vuelve a ser captado por el aminoácido aceptor durante la desaminación reductiva. No todos los aminoácidos pueden ser utilizados por todos los clostridios peptolíticos.

Fermentación butírica y acética por no esporulados. Por el tipo de productos de fermentación existen varios géneros de bacterias anaeróbicas relacionadas con los clostridios; no obstante, no se trata de esporulados, y muchos de ellos son Gram negativos. La mayoría de los no esporulados formadores de butírico y acético se han aislado de la panza, donde participan en la degradación de la celulosa, el almidón y otros hidratos de carbono. Producen mucho hidrógeno y anhídrido carbónico y posibilitan el que las bacterias metanogénicas formen metano. Como bacteria formadora de ácido butírico en la panza hay que mencionar *Butyrivibrio fibrisolvens*.

Como formador de ácido acético en la panza hay que presentar a *Ruminococcus albus*, un coco anaeróbico estricto que utiliza la celulosa y el xilano, así como muchos azúcares. Puede fermentar 1 mol de glucosa a 2 moles de acetato, 2 moles de anhídrido carbónico y 2 moles de H_2, en el supuesto, no obstante, de que la concentración de hidrógeno producido se mantenga baja. Esto es posible en un cultivo mixto con una bacteria que utilice el hidrógeno, por ejemplo *Wolinella succinogenes* (Fig. 8.8). El

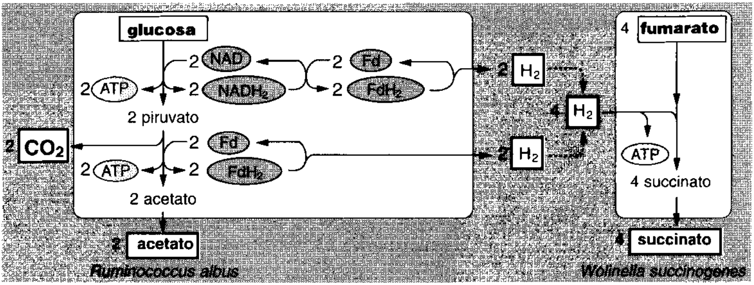


Fig. 8.8 Fermentación de la glucosa por *Ruminococcus albus* y utilización del hidrógeno producido en un cultivo mixto con *Wolinella succinogenes*. La simbiosis ofrece un ejemplo de transferencia de un sustrato de célula ("interspecies hydrogen transfer").

esquema de fermentación establece claramente que en la fermentación acética pura se forman 4 moles de ATP por mol de glucosa. Esta elevada eficacia en la regeneración del ATP presupone no obstante, que todos los equivalentes de reducción formados en la degradación de la glucosa puedan liberarse en forma de hidrógeno.

Clostridios como patógenos y formadores de toxinas. Algunos clostridios peptolíticos se presentan como patógenos en infecciones de heridas (gangrena gaseosa y tétanos) así como causantes de intoxicaciones alimentarias. Las esporas están ampliamente distribuidas en el suelo. Si llegan esporas de *Clostridium histolyticum* o de *C. septicum* a una herida abierta, a la que no tenga acceso el aire o en la que las bacterias aeróbicas debido al consumo de oxígeno proporcionen condiciones anaeróbicas, estas células podrán crecer, y descomponer con la ayuda de unas *proteinasas* al colágeno y a otras proteínas produciendo abundantes productos de fermentación y gas. Este tipo de gangrena gaseosa y herida se podía combatir, anteriormente, únicamente por amputación de los miembros. Una enfermedad de las infecciones de las heridas que actualmente todavía es temida y está ampliamente extendida es el tétanos; está originada por *Clostridium tetani*. Durante el crecimiento esta bacteria excreta una toxina neurotóxica muy activa, que conduce a la tetanización de los músculos.

La intoxicación alimentaria más grave, el botulismo, está provocada por *Clostridium botulinum*. Es una bacteria del suelo ampliamente extendida que se desarrolla sobre productos cárnicos insuficientemente esterilizados y en conservas de leguminosas. Recibe su nombre por presentarse en embutidos (botulus = embutido). Forma una toxina que después de haberse ingerido el alimento conduce a una paralización de los nervios y a la muerte por paralización de la respiración. Afortunadamente la toxina es termolábil y se inactiva rápidamente por cocción (15 min).

8.6 Fermentación homoacética: anhídrido carbónico como aceptor de hidrógenos

Algunos clostridios (*Clostridium formicoaceticum, C. thermoaceticum, C. acidi-urici* y *C. cylindrosporum*) son capaces de transferir únicamente al anhídrido carbónico los hidrógenos liberados del sustrato en las reacciones iniciales de oxidación, formando entonces acetato:

$$8\,[H] + 2\,CO_2 \longrightarrow CH_3\text{–}COOH + 2\,H_2O$$

El termófilo *C. thermoaceticum* y el mesófilo *C. formicoaceticum* fermentan las hexosas preferentemente hasta acetato. La mayor parte del

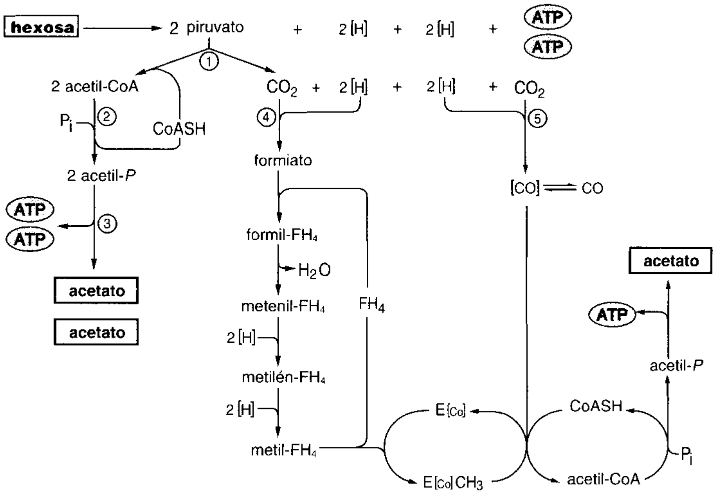

hexosa
2 piruvato
2 [H]
2 [H]
ATP
ATP
①
2 acetil-CoA
CO2
2 [H]
2 [H]
CO2
Pi
②
CoASH
④
⑤
2 acetil-P
formiato
[CO]
CO
ATP
ATP
③
formil-FH4
H2O
acetato
acetato
acetato
metenil-FH4
FH4
ATP
2 [H]
metilén-FH4
acetil-P
2 [H]
E[Co]
CoASH
metil-FH4
Pi
E[Co]CH3
acetil-CoA

Fig. 8.9 Vía de biosíntesis de acetato a partir de hexosas por *Clostridium thermoaceticum* a través de la vía del acetil-CoA. Aclaraciones en el texto. Símbolos: E[Co], corrinoide-proteína; FH_4, tetrahidrofolato; [H] equivalente de hidrógeno, como $NADH_2$ o FdH_2; CO, monóxido de carbono exógeno; [CO], CO ligado.

anhídrido carbónico liberado en la escisión del piruvato ha de volverse por tanto a fijar y utilizarse como aceptor de hidrógenos. La formación de acetato a partir de CO_2 y los equivalentes de reducción (electrones) liberados en las reacciones de oxidación iniciales siguen el esquema que está indicado en la figura 8.9.

Las hexosas se oxidan en los clostridios hasta piruvato a través de la vía normal de la fructosabifosfato, y éste se transforma en acetato, CO_2, FdH_2 y ATP mediante la *piruvato-ferredoxina-oxidorreductasa* (1), *fosfotransacetilasa* (2) y *acetato-quinasa* (3). Como aceptor del hidrógeno de la fermentación actúa el CO_2. En parte se reduce por la *formiato-deshidrogenasa* (4) hasta formiato y posteriormente al grupo metílico de una tercera molécula de acetato; otra parte se reduce a CO por la *CO deshidrogenasa* (5), que forma el grupo carboxilo del acetato. La reducción del grupo formilo al metilo tiene lugar con la participación del tetrahidrofolato (FH_4) como coenzima; por último, el grupo metilo se transfiere a una proteína con un corrinoide (B_{12}-coenzima-proteína) y se carboxila por adición del monóxido de carbono fijado. El producto de la transformación es acetil-coenzima A; a partir de él se forma acetato por la vía habitual con regeneración de ATP.

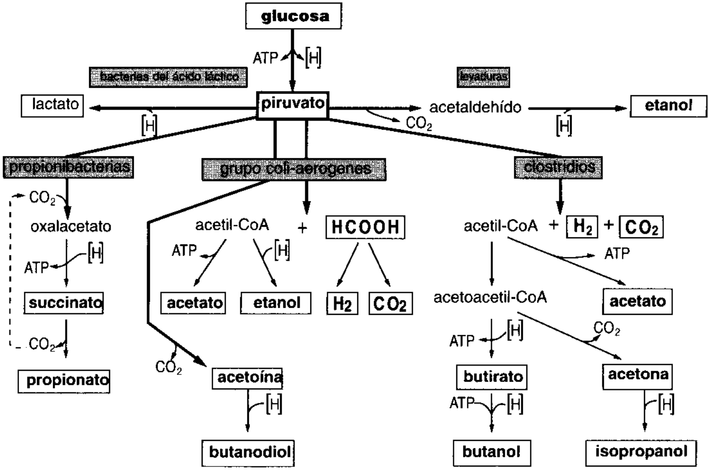

glucosa
ATP
[H]
bacterias del ácido láctico
levaduras
lactato
piruvato
acetaldehído
CO2
etanol
[H]
[H]
propionibacterias
grupo coli-aerogenes
clostridios
CO2
oxalacetato
[H]
ATP
succinato
CO2
propionato
acetil-CoA
+
HCOOH
ATP
[H]
acetato
etanol
H2
CO2
CO2
acetoína
[H]
butanodiol
acetil-CoA
+
H2
+
CO2
ATP
acetoacetil-CoA
acetato
ATP
[H]
CO2
butirato
acetona
ATP
[H]
butanol
[H]
isopropanol

Fig. 8.10 Visión conjunta de los procesos y de los productos de las fermentaciones más importantes.

Esta vía de síntesis de acetil-CoA a partir de CO_2 y de equivalentes de hidrógeno, la **vía reductiva del acetil-CoA**, es en gran parte idéntica a la síntesis de acetato por las bacterias metanogénicas de respiración anaeróbica y por las bacterias acetogénicas (apartado 9.4 y 9.5).

En *C. formicoaceticum* y *C. thermoaceticum* se ha encontrado citocromo b. Aún hay que demostrar si estas bacterias, lo mismo que *C. aceticum* y otros clostridios, pueden obtener energía mediante la fosforilación en el transporte de electrones (apartado 9.5).

8.7 Productos naturales fermentables y no fermentables

La mayoría de los productos naturales formados por carbono, hidrógeno, oxígeno y/o nitrógeno pueden ser fermentados bajo condiciones anaeróbicas. Condición necesaria para la fermentación es la posibilidad de oxidar parcialmente el sustrato mediante una rotura intramolecular en una reacción exergónica. Son fermentables, por ejemplo, los polisacáridos, las hexosas, las pentosas, las tetrosas y los polioles; los ácidos orgánicos (entre ellos los azúcares ácidos, gluconato, malato, tartrato, etc.); aminoácidos (con excepción de los aromáticos que sólo son fermentables en determinadas condiciones); purinas y pirimidinas.

Frente a los compuestos fermentables existen aquellos que han demostrado ser inatacables bajo condiciones anaeróbicas: hidrocarburos alifáticos saturados y aromáticos, esteroides, carotenoides, terpenos y porfirinas. Estos compuestos son degradados en condiciones aeróbicas hasta una oxidación total, pero son estables bajo condiciones anaeróbicas. Esta estabilidad se basa en dos puntos: a) La mayoría de los compuestos citados contienen exclusivamente átomos de carbono e hidrógeno. En la rotura intramolecular no se obtiene ninguna energía. b) Los hidrocarburos saturados y los polisoprenoides sólo son oxidables en presencia de oxígeno molecular; el primer ataque viene determinado por una *oxigenasa.* La elevada estabilidad de los hidrocarburos bajo condiciones anaeróbicas se comprueba en cualquier experiencia de laboratorio, y es probablemente la causa de que los hidrocarburos se hayan mantenido tanto tiempo en los pozos de petróleo. Los microorganismos ya eran incapaces de fermentar las parafinas en el momento en que se formó el petróleo, y hasta ahora no han podido adquirir esta capacidad. No obstante, parece factible una respiración anaeróbica, limitada, de los hidrocarburos aromáticos y alifáticos.

9. Transporte de electrones en condiciones anaeróbicas

En los sedimentos, lagunas y suelos permanentemente inundados, esto es, en ecosistemas con condiciones anóxicas (sin oxígeno), se desarrollan frecuentemente bacterias que obtienen su energía metabólica por "**respiración anaeróbica**". Estas bacterias utilizan como fuentes de carbono y dadores de hidrógeno a aquellos compuestos producidos por las bacterias fermentadoras, o que éstas no han utilizado. Se encuentran al final de la cadena alimentaria anaeróbica (pág. 295, 352).

Los "respiradores anaeróbicos" pueden utilizar como aceptores de H al nitrato, al sulfato, al azufre, al carbonato, al hierro férrico (III) entre otros. El **nitrato** se reduce a óxido nitroso y nitrógeno molecular, el **sulfato** y el **azufre** elemental a sulfhídrico, el **dióxido de carbono** y el **carbonato** a acético o metano y el **hierro (III)** a hierro ferroso (II). Los procesos de reducción, un resumen del proceso metabólico y las bacterias implicadas se indican en la figura 9.1.

La transferencia de los electrones liberados de los sustratos orgánicos hasta los iones inorgánicos o compuestos antes mencionados permite una fosforilación en el transporte de electrones y una ganancia energética. Las relaciones energéticas las consideramos ya anteriormente (apartado 7.4, pág. 258, 264).

Los respiradores anaeróbicos tienen una importancia de primer orden para comprender los procesos que tienen lugar en la naturaleza, los ciclos de los elementos y el mantenimiento de los equilibrios en la biosfera. Se trata siempre de procariotas. La respiración anaeróbica es uno de los tipos fisiológicos que con toda seguridad predominaron en los tiempos primitivos de la evolución de los organismos y que condujeron en los sedimentos arcaicos al almacenamiento de carbono orgánico.

Los **productos de la respiración anaeróbica** son muy evidentes: se reconocen como burbujas de aire ascendentes (N_2, N_2O, CH_4), por su olor característico (H_2S), en la formación de un gas inflamable (CH_4) y en la formación de óxidos de hierro diamagnéticos. También hay que resaltar que los respiradores anaeróbicos desempeñan un papel muy importante en la economía.

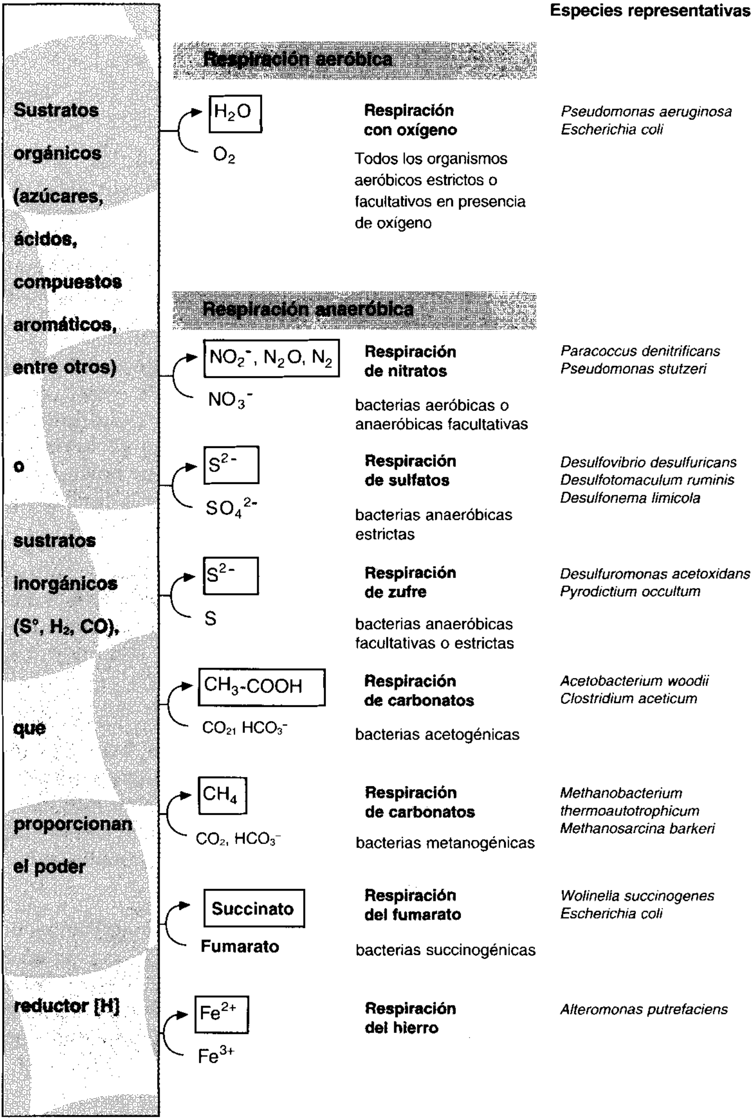

Especies representativas
Sustratos orgánicos (azúcares, ácidos, compuestos aromáticos, entre otros) o sustratos inorgánicos (S°, H₂, CO), que proporcionan el poder reductor [H]
Respiración aeróbica
H_2O
O_2
Respiración con oxígeno
Todos los organismos aeróbicos estrictos o facultativos en presencia de oxígeno
Pseudomonas aeruginosa
Escherichia coli
Respiración anaeróbica
NO_2^-, N_2O, N_2
NO_3^-
Respiración de nitratos
bacterias aeróbicas o anaeróbicas facultativas
Paracoccus denitrificans
Pseudomonas stutzeri
S^{2-}
SO_4^{2-}
Respiración de sulfatos
bacterias anaeróbicas estrictas
Desulfovibrio desulfuricans
Desulfotomaculum ruminis
Desulfonema limicola
S^{2-}
S
Respiración de zufre
bacterias anaeróbicas facultativas o estrictas
Desulfuromonas acetoxidans
Pyrodictium occultum
CH_3-COOH
CO_2, HCO_3^-
Respiración de carbonatos
bacterias acetogénicas
Acetobacterium woodii
Clostridium aceticum
CH_4
CO_2, HCO_3^-
Respiración de carbonatos
bacterias metanogénicas
Methanobacterium thermoautotrophicum
Methanosarcina barkeri
Succinato
Fumarato
Respiración del fumarato
bacterias succinogénicas
Wolinella succinogenes
Escherichia coli
Fe^{2+}
Fe^{3+}
Respiración del hierro
Alteromonas putrefaciens

Fig. 9.1 Procesos para la obtención de energía por fosforilación en el transporte de electrones en condiciones aeróbicas y anaeróbicas, también denominados "respiración aeróbica" y "respiración anaeróbica".

9.1 Respiración de nitratos: desnitrificación y amonificación del nitrato

El grupo fisiológico de los respiradores de nitratos es capaz de transferir el hidrógeno del sustrato, esto es, los electrones, hasta el nitrato, con lo que reducen al nitrato y producen energía en la fosforilación del transporte electrónico. El proceso se denomina **respiración de nitratos** o **reducción disimilatoria del nitrato.** En beneficio de los puntos de vista ecológicos y bioquímicos hay que diferenciar entre dos tipos metabólicos y grupos bacterianos:

(1) Los **desnitrificantes** son bacterias aeróbicas, respiratorias estrictas. No son capaces de crecer anaeróbicamente sin nitrato. Anaeróbicamente –con nitrato como único aceptor de H– el nitrato se reduce a óxido nitroso volátil (N_2O) y a nitrógeno molecular (N_2) que son liberados. Por tanto, se entiende por **desnitrificación** a la transformación de nitrógeno combinado (nitrato) a N_2 libre. Esta desnitrificación o **liberación de nitrógeno** es el único proceso biológico por el que el nitrógeno fijado orgánica o inorgánicamente se puede liberar en N_2 y se recicla. Entre los desnitrificantes debemos mencionar algunos nombres representativos, *Pseudomonas denitrificans, Paracoccus denitrificans, Thiobacillus denitrificans, Pseudomonas aeruginosa* y *Bacillus licheniformis.*

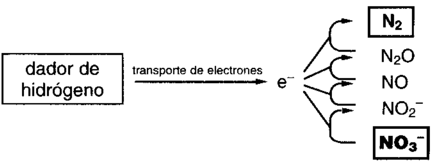
(2) Hay varios grupos de microorganismos capaces de una **amonificación del nitrato**, sobre todo el importante grupo de las Enterobacteriáceas (*Escherichia coli, Enterobacter aerogenes*). Se trata siempre de bacterias anaeróbicas facultativas, que pueden fermentar en condiciones anaeróbicas. No obstante, cuando tienen nitrato a su disposición lo utilizan como aceptor externo de H y lo reducen inicialmente a nitrito. Éste también puede ser reducido, pero no a N_2, sino a través de una reducción asimilatoria de nitrato hasta amoniaco (NH_3) o bien amonio (NH_4^+). La amonificación del nitrato no conduce por tanto a una liberación del nitrógeno.

9.1.1 Respiración de nitrato: desnitrificación

La transformación del nitrato hasta N_2 con los equivalentes de reducción de los sustratos (compuestos orgánicos o H_2) sigue la estequiometría

$$10\,[H] + 2\,H^+ + 2\,NO_3^- \longrightarrow N_2 + 6\,H_2O$$

tiene lugar según los pasos indicados en el esquema



Cada paso está catalizado por un enzima específico. La *nitrato-reductasa A* es un enzima que contiene molibdeno y está ligado a membranas. El nitrito formado se reduce por una *nitrito-reductasa* igualmente ligada a membranas hasta óxido nítrico (NO). Éste se reduce por la *NO-reductasa* hasta óxido nitroso (N_2O) y éste por último a N_2 por una *N_2O-reductasa*. Depende de las condiciones ambientales el que la reducción del nitrato se dé sin acumulación de productos intermediarios hasta la liberación de N_2, o si se acumulan y liberan NO_2^-, NO o N_2O. La liberación de nitrito, NO o N_2O tiene lugar cuando el nitrato está en exceso y la concentración de dadores de H limita la transformación. Señalemos que los óxidos de nitrógeno no llegan a la atmósfera únicamente por combustiones incompletas de carbón o petróleo, sino que también son un producto de las transformaciones biológicas en el suelo y en los sedimentos acuáticos.

Aparentemente no existe ningún desnitrificante que sea anaeróbico estricto. Las bacterias disponen preferentemente del sistema respiratorio completo; el sistema enzimático necesario para la desnitrificación se induce o desreprime únicamente bajo condiciones anaeróbicas (Fig. 9.2). En muchos desnitrificantes esta inducción tiene lugar únicamente en presencia de nitrato, en algunas es suficiente el que se establezcan condiciones anaeróbicas. Muchos desnitrificantes crecen no sólo con nitrato, sino también con nitrito, e incluso con óxido de nitrógeno como aceptor de hidrógenos. De aquí se deduce que no sólo la *nitrato-reductasa A*, sino también los enzimas disimilatorios reductores de nitrito, NO y N_2O, están acoplados a la cadena respiratoria.

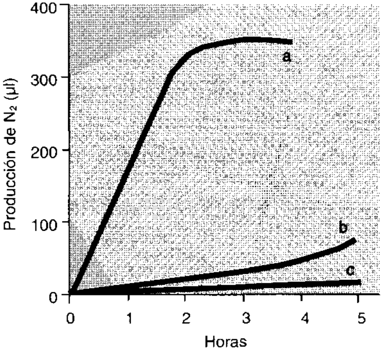


Fig. 9.2 Velocidad de producción de nitrógeno por suspensiones de células de *Paracoccus denitrificans*. La liberación de N_2 tiene lugar por desnitrificación del nitrato con acetato como sustrato en condiciones anaeróbicas. Las bacterias han crecido en diferentes condiciones: a anaeróbicamente con nitrato; b aeróbicamente con nitrato; y c aeróbicamente sin nitrato (según VAN OLDEN, E. de KLUYVER, A.J., C.B. VAN NIEL: The Microbes Contribution to Biology. Harvard Univ. Press, Cambridge [Mass.] 1956).

Cultivo de enriquecimiento de bacterias desnitrificantes. Si se inocula con tierra o limos un medio de cultivo que contenga dadores de hidrógeno, componentes celulares y nitrato, y se incuba en ausencia de oxígeno (Tab. 6.4) pueden desarrollarse diversas especies de bacterias: a) con unas trazas de peptona y etanol o propionato *Pseudomonas aeruginosa*; b) con glucosa *Pseudomonas fluorescens*; c) con tartrato, succinato o malato *Pseudomonas stutzeri*; d) con ácidos orgánicos, alcohol o extracto de carne con concentraciones altas de nitrato (5-12% KNO_3) *Bacillus licheniformis*; e) con trazas de extracto de carne y con hidrógeno molecular como dador de hidrógeno *Paracoccus denitrificans*, y f) con azufre o tiosulfato *Thiobacillus denitrificans*. Como muchos desnitrificantes utilizan el nitrato exclusivamente o preferentemente como aceptor de hidrógenos, pero no son capaces de reducirlo hasta amonio, hay que añadir una fuente de N (peptona o sales de amonio).

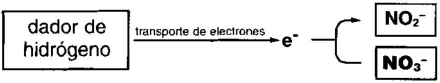
Pérdidas de nitrógeno en el suelo por desnitrificación. La desnitrificación bacteriana es con toda seguridad la responsable de las pérdidas de nitrógeno del suelo en puntos determinados y épocas determinadas. Tiene un papel importante en los hábitats anaeróbicos y se desarrolla fácilmente cuando se dan acúmulos de agua, sobre todo cuando simultáneamente se emplean abonos orgánicos y nitrato. En los arrozales los abonos con nitrato pueden resultar perjudiciales por acumulación de nitrito. El nitrito se acumula también en las aguas residuales que contengan nitrato y estén mal aireadas, llegando ocasionalmente a las aguas de bebida. La dependencia de las pérdidas de N con respecto a la aireación del suelo es una consecuencia de la regulación a la que está sometido el sistema enzimático de las bacterias reductoras de nitrato. Los enzimas implicados se inducen por el nitrato exclusivamente bajo condiciones anaeróbicas (Fig. 9.2); el oxígeno reprime la formación de *nitrato-* y *nitrito-reductasa*. Si ya se han sintetizado los enzimas y las células son transferidas a condiciones en las que hay oxígeno, éste compite con el nitrato por los electrones que aporta la cadena respiratoria, reprime igualmente la función del sistema reductor de nitratos.

Significado de la desnitrificación en la economía de la naturaleza. La desnitrificación es el único proceso biológico en el que el nitrógeno combinado pasa a nitrógeno molecular. Este proceso, considerado globalmente, es de una importancia decisiva para el mantenimiento de la vida y de la biomasa de la Tierra. En los suelos aireados normalmente, así como en las aguas, el nitrato es el producto final de la mineralización. Debido a su elevada solubilidad en el agua y a su baja absorción por el suelo los iones nitrato serían lavados y se acumularían en las aguas del mar; esto supondría que la atmósfera fuera empobreciéndose en nitrógeno molecular. Sobre la Tierra cesaría el crecimiento de los vegetales y la producción de biomasa.

9.1.2 Respiración de nitrato: amonificación del nitrato

Muchas bacterias anaeróbicas facultativas que anaeróbicamente pueden crecer por fermentación, como *Escherichia coli* y *Enterobacter aeroge-*

nes, pueden resultar beneficiadas por la presencia de nitrato, ya que pueden transferirle los electrones del sustrato y producir nitrito.



Se puede acumular nitrito en el medio de cultivo; no se da por tanto una pérdida de N_2. En lugar de lo hasta ahora indicado, el nitrito puede reducirse hasta amonio por la vía de la reducción asimilatoria de nitritos para luego ser secretado. Se habla entonces también de una amonificación de nitrato. La reducción del nitrito a amonio no permite ninguna ganancia energética. Se trata más bien de un proceso fermentativo en el que el nitrito actúa como un aceptor exógeno de electrones. Por eso, en último término, los organismos obtienen un provecho en la reducción del nitrito, ya que durante la fermentación de la glucosa pueden introducir una parte de los equivalentes de reducción en la reducción del nitrito y liberar una mayor parte de acetato (pág. 293, reacción 3).

Asimilación de nitrato. A modo de anexo discutiremos aquí la asimilación del nitrato (o reducción de nitrato asimilatoria) en contraposición a la respiración de nitratos (o reducción de nitratos disimilatoria). El nitrato, junto al amonio, es la fuente de nitrógeno más común para bacterias y vegetales. La mayoría de las bacterias utilizan los enzimas de la asimilación del nitrato. Se forman cuando aparte del nitrato no hay ninguna otra fuente de nitrógeno y tanto en condiciones aeróbicas como anaeróbicas. La presencia de amonio reprime en general la formación de los enzimas de la reducción asimilatoria del nitrato. Ésta conduce a la formación de amonio y consume mucho poder reductor.

$$8\,[H] + H^+ + NO_3^- \longrightarrow NH_4^+ + OH^- + 2\,H_2O$$

El amonio es la forma del nitrógeno que se incorpora a los aminoácidos y a otros metabolitos nitrogenados.

La reducción del nitrato conduce a través de varios compuestos intermediarios, de los que sólo puede liberarse el nitrito, y está catalizada por dos enzimas.

$$\underbrace{NO_3^- \xrightarrow{2\,e^-} NO_2^-}_{\textit{nitrato-reductasa B}} \underbrace{\xrightarrow{2\,e^-} HNO \xrightarrow{2\,e^-} NH_2OH \xrightarrow{2\,e^-} NH_3}_{\textit{nitrito-reductasa}}$$

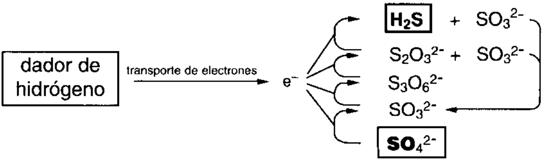
El primer paso lo cataliza la *nitrato-reductasa B*, localizada en el citoplasma. El nitrito formado se reduce a amoniaco por la *nitrito-reductasa*, igualmente un enzima citoplasmático. Para ello se requieren 6 electrones.

Éstos los aporta el NAD(P)H_2 (hongos y bacterias) o la ferredoxina (plantas y bacterias). El enzima es complejo y además de los centros sulfoférricos contiene centros siderohemo. La reacción catalizada por la *nitrito-reductasa* se asemeja a la de la *nitrogenasa* y a las transformaciones catalizadas por la *sulfito-reductasa* en que se transfieren 6 electrones a los sustratos respectivos y no se libera ningún producto intermediario.

Formación de metahemoglobina como consecuencia de la acumulación de nitrato en las aguas de bebida y en los productos alimentarios. El consumo de aguas de bebida que contengan nitrato (frecuente en épocas de sequía) y en verduras (espinacas abonadas en exceso) puede conducir a enfermedades debido a la reducción bacteriana de nitratos en las conservas o en el intestino. La reducción de nitrato a nitrito por microorganismos y la captación de nitrito por la sangre son las causas de la formación de metahemoglobina. La fijación del nitrito a la hemoglobina conduce a la formación de metahemoglobina, en la que el oxígeno queda fijado de forma irreversible. La consecuencia es la incapacidad de los eritrocitos para transportar oxígeno, lo que provoca una cianosis. Esta enfermedad se da únicamente en niños por debajo de los seis meses. En ellos parece que las bacterias reductoras de nitratos pueden pasar por el estómago sin quedar lesionadas; en el intestino reducen el nitrato, crecen y acumulan nitrito. En los niños mayores y en los adultos las bacterias que respiran nitratos mueren en el jugo intestinal extremadamente ácido, y los iones nitrato son reabsorbidos, antes de que puedan ser reducidos en el duodeno, donde el pH ya es permisivo.

9.2 Formación de sulfhídrico por reducción del sulfato

El grupo fisiológico de las bacterias reductoras de sulfato, también llamadas desulfuricantes, se caracteriza por la capacidad de poder transferir el hidrógeno del sustrato hasta el sulfato como aceptor terminal de electrones, y de reducir el sulfato a sulfuro. Este proceso posibilita un transporte de electrones; en él está implicado el citocromo c. Se obtiene energía por una fosforilación en el transporte de electrones bajo condiciones anaeróbicas.



Como desde el punto de vista formal este tipo de reducción de sulfatos es semejante a la respiración con el oxígeno como aceptor final de hidrógeno, se habla también de una **"respiración de sulfatos"** o de una "reducción disimilatoria de sulfato". El producto principal de esta reducción de sulfatos es el sulfuro de hidrógeno:

$$8\,[H] + 2\,H^+ + SO_4^{2-} \longrightarrow H_2S + 4\,H_2O$$

La porción principal del sulfuro de hidrógeno producido en la naturaleza procede de esta reacción. Las bacterias productoras de sulfato son, en oposición a las bacterias reductoras de nitratos, **organismos anaeróbicos estrictos** y, por tanto, van siempre **ligados a condiciones anaeróbicas**.

Situación sistemática. Varios grupos de bacterias anaeróbicas son capaces de realizar una respiración de sulfatos. Entre ellas se cuentan eubacterias Gram negativas flageladas e inmóviles (*Desulfovibrio, Desulfobacterium, Desulfococcus, Desulfomonas, Desulfobulbus, Desulfosarcina, Thermosulfobacterium*), bacterias Gram negativas deslizantes (*Desulfonema*), eubacterias Gram positivas formadoras de esporas (*Desulfotomaculum*) y arqueobacterias (*Archaeglobus*). Como dadores de hidrógeno para una u otra de estas bacterias pueden actuar compuestos sencillos de bajo peso molecular: lactato, acetato, propionato, butirato, formiato, metanol, etanol, ácidos grasos superiores, compuestos aromáticos e hidrógeno. Sin embargo, ninguna bacteria puede utilizar todos estos compuestos, y ningún sustrato es utilizado por todas las bacterias. El grupo de los respiradores de sulfato es muy heterogéneo con respecto a las vías metabólicas en la utilización de los sustratos. Sin entrar en detalles, indicaremos los subgrupos.

(1) Las especies conocidas hasta una década crecen con lactato, entre otros ácidos orgánicos, y utilizan H_2. No obstante, oxidan al dador de H de forma incompleta y liberan acetato. Pertenecen especies de *Desulfovibrio* y *Desulfotomaculum*.

(2) Desde entonces se han aislado especies que pueden utilizar acetato, ácidos grasos de cadena corta y larga, alcoholes, compuestos aromáticos y H_2. A este grupo pertenecen *Desulfotomaculum acetoxidans, Desulfobacter* y *Desulfonema* entre otros.

(3) Algunas especies pueden crecer autotróficamente con H_2 y sulfato o tiosulfato. Son cepas de *Desulfovibrio, Desulfobacterium, Desulfococcus, Desulfobacter* y *Desulfotomaculum*, así como *Archaeoglobus*, una arqueobacteria hipertermófila capaz de crecer autotróficamente con H_2 y tiosulfato.

(4) Una sorpresa es la ganancia de energía por la dismutación de tiosulfato o sulfito a sulfuro y H_2S por un nuevo aislamiento, *Desulfovibrio sul-*

fodismutans. Las cepas crecen autotróficamente, o como quimiolitoheterótrofos con acetato. El tipo fisiológico puede considerarse como una “fermentación inorgánica”.

Reducción del sulfato. Casi todas las bacterias, hongos y plantas verdes son capaces de crecer con sulfato como fuente de azufre. Obtienen el sulfuro necesario para la síntesis de los aminoácidos azufrados mediante una “reducción asimilatoria de sulfato”.

El primer paso es común a la reducción disimilatoria y a la asimilatoria del sulfato. Mientras que en la primera el sulfato activado se reduce directamente, en la reducción del sulfato asimilatoria existe un segundo paso de activación. La reducción de sulfato se inicia en la célula con una activación del sulfato que requiere mucha energía mediante el ATP (Fig. 9.3); gracias a una *ATP-sulfurilasa* (*sulfato-adeniltransferasa*) se intercambia el resto difosfato del ATP por un sulfato:

ATP + SO_4^{2-} $\leftrightharpoons$ adenosín-5’-fosfosulfato + PP_i

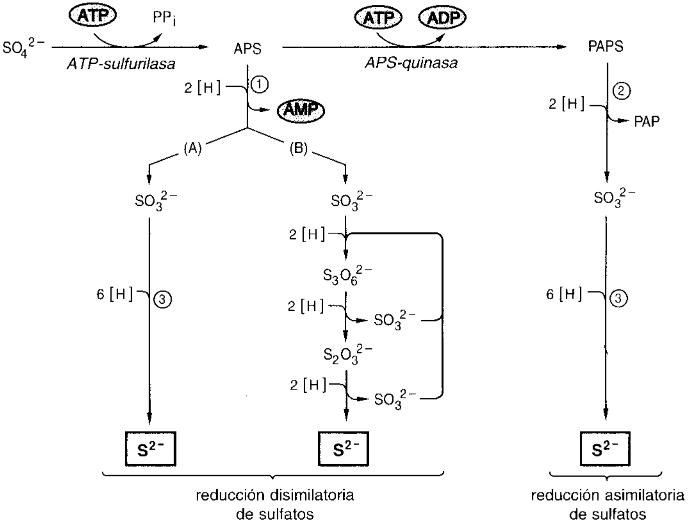

ATP
PPi
SO4 2−
ATP-sulfurilasa
APS
ATP
ADP
APS-quinasa
PAPS
2 [H]
①
AMP
②
2 [H]
PAP
(A)
(B)
SO3 2−
SO3 2−
SO3 2−
2 [H]
S3O6 2−
6 [H]
③
2 [H]
SO3 2−
S2O3 2−
2 [H]
SO3 2−
6 [H]
③
S2−
S2−
S2−
reducción disimilatoria de sulfatos
reducción asimilatoria de sulfatos

Fig. 9.3 Esquema de la reducción disimilatoria del sulfato (respiración del sulfato) y de la reducción asimilatoria del sulfato. APS = adenosín-5’-fosfosulfato; PAPS = fosfoadenosín-5’-fosfosulfato; PAP = fosfoadenosín-5’-fosfato. Enzimas implicados: (1) *APS-reductasa*; (2) *PAPS-reductasa*; (3) *sulfito-reductasa* (= *bisulfito reductasa*).

El difosfato se escinde mediante una *difosfatasa*. El adenosín-5'-fosfosulfato (APS) es el producto de la activación. Los pasos subsiguientes son distintos. En la **reducción asimilatoria del sulfato** el APS se fosforila mediante una *APS-quinasa* con ATP hasta fosfoadenosinfosfosulfato (PAPS); este sulfato doblemente activado se reduce a través del sulfito hasta sulfuro. En la **reducción disimilatoria del sulfato** el APS se reduce a sulfito con formación de AMP mediante la *APS-reductasa.*

La **reducción del sulfito** a sulfuro tiene lugar en las distintas bacterias aparentemente por vías distintas. La *sulfito-reductasa* reduce directamente al sulfito hasta sulfuro mediante un paso simultáneo de seis electrones, sin que se detecten productos intermedios. En este tipo de reducción –igual que en la reducción asimilatoria del sulfito– parecen estar implicados de forma general compuestos de hierro porfirínico (desulfoviridina, desulforrubidina). Según el segundo mecanismo el sulfito se reduce en el curso de tres pasos sucesivos en los que aparecen productos intermediarios (tritionato y tiosulfato) (Fig. 9.3). Se cree que los electrones necesarios para la reducción del sulfito son suministrados a través de citocromos (en algunas bacterias citocromo b, en otras citocromo c).

Fosforilación en el transporte de electrones. La suposición de una fosforilación en el transporte de electrones en las bacterias desulfuricantes se basa en la demostración de citocromos y de proteínas sulfoférricas en la membrana citoplasmática y en la considerable ganancia de energía. El citocromo c_3 –comparado con otros citocromos– presenta un potencial redox eminentemente negativo ($E_0' = -205$ mV) y se localiza en la cara externa de la membrana, o en el espacio periplasmático.

Las especies bien estudiadas hasta el momento de bacterias reductoras de sulfatos disponen de una *hidrogenasa* constitutiva (*H_2-citocromo-c_3-óxido-reductasa*) mediante la cual puede captarse y activarse el H_2, así como liberarse. Algunas bacterias reductoras de sulfato crecen con H_2 y sulfato como única fuente energética. La capacidad de reducir el sulfato con el hidrógeno y de producir grandes cantidades de sulfuro de hidrógeno, sin crecer apreciablemente, es probablemente una característica propia de la mayoría de las bacterias reductoras de sulfatos.

El transporte de electrones del hidrógeno molecular como dador de hidrógenos con la reducción de 1 mol de sulfato o 1 mol de sulfuro es probablemente un proceso ligado a la regeneración de 3 moles de ATP, de los cuales 2 se consumen en la activación del sulfato.

Asimilación autotrófica de CO_2. La capacidad de crecer autotróficamente se comprobó a lo largo de cuarenta años, pero no estaba suficientemente demostrada. Ahora se ha podido establecer cuantitativamente. Las vías de la fijación del CO_2 son la **vía reductiva del acetil-CoA** (pág. 356) o el **CAT reductivo**, no el ciclo de CALVIN (apartado 11.5).

Oxidación de sustratos orgánicos. Los reductores de sulfatos clásicos, como por ejemplo *Desulfovibrio vulgaris*, no disponen de un CAT completo y liberan acetato. Entre las especies que utilizan acetato existen algunas que lo oxidan a través del **CAT oxidativo** (*Desulfobacter postgatei*) y aquellos que lo hacen a través de la **vía oxidativa del acetil-CoA** (*Desulfobacterium*, *Desulfosarcina*, *Desulfococcus*, *Desulfotomaculum*). Por tanto, las cepas utilizan de forma inversa para la oxidación del acetato la misma vía que utilizan de forma reductiva para la fijación del CO_2. La mayoría de las bacterias de aislamiento reciente son capaces de utilizar acetato, ácidos grasos de cadena larga y compuestos aromáticos.

Asimilación de sustratos orgánicos. La energía metabólica obtenida durante la fosforilación en el transporte de electrones posibilita la asimilación de sustancias orgánicas (ácidos orgánicos, aminoácidos, mezclas complejas). Algunas cepas son capaces de sintetizar material celular a partir de acetato y anhídrido carbónico, cuando el hidrógeno molecular actúa como dador de hidrógenos. La asimilación de sustancias orgánicas en el curso de la oxidación de un dador de hidrógeno inorgánico puede considerarse como una "quimiolitoheterotrofia".

Fermentación sin sulfato. Algunos desulfuricantes son también capaces de transformar el lactato o el piruvato sin sulfato. En lugar de una oxidación del piruvato

$$4\ CH_3\text{–}CO\text{–}COOH + H_2SO_4 \longrightarrow 4\ CH_3\text{–}COOH + 4\ CO_2 + H_2S$$

tiene lugar una fermentación con liberación de H_2:

$$CH_3\text{–}CO\text{–}COOH + H_2O \longrightarrow CH_3\text{–}COOH + CO_2 + H_2$$

En la fermentación del lactato los desulfuricantes se reconocen como fermentadores en potencia.

Enriquecimiento y aislamiento. Para enriquecer las bacterias reductoras de sulfatos el medio de cultivo debe disponer de un dador de hidrógenos apropiado, un sustrato asimilable, minerales y sulfato; también hay que asegurar condiciones anaeróbicas y un potencial redox suficientemente bajo ($E_0' = -200$ mV) (Fig. 9.4).

Distribución y papel de los desulfuricantes en la naturaleza. Las bacterias reductoras de sulfatos se presentan predominantemente en los **lodos**, donde las sustancias orgánicas sufren una descomposición anaeróbica. Los desulfuricantes parecen estar especialmente adaptados a los produc-

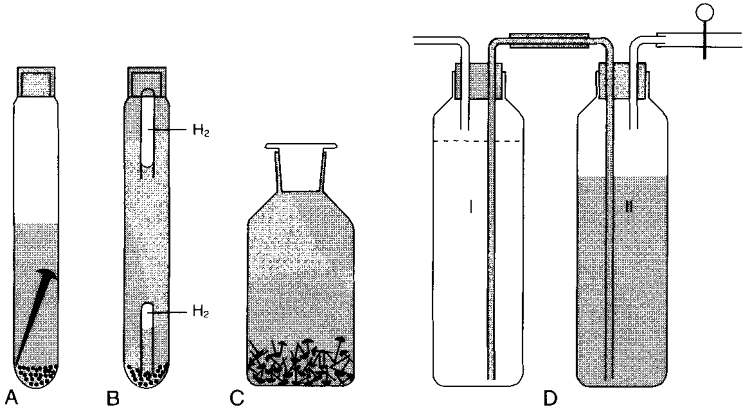
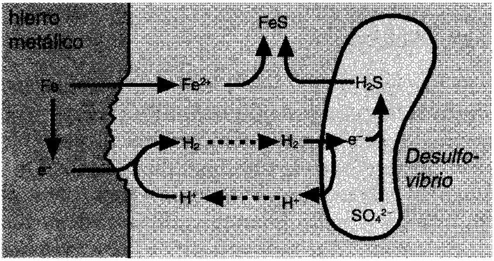


Fig. 9.4 Cultivos de enriquecimiento de bacterias que reducen el sulfato. Crecimiento tras inoculación con cieno: **A** En un medio de cultivo con lactato y sulfato; el clavo de hierro suministra por polarización catódica un potencial redox suficientemente bajo. **B** Demostración de la utilización del hidrógeno molecular por las bacterias reductoras de sulfatos; tubos de DURHAM llenos de hidrógeno, antes (flotanto) y después (en el suelo) de incubar el cultivo. **C** Crecimiento con trazas de materia orgánica con reducción de sulfato y corrosión anaeróbica del hierro en una "botella con tapón esmerilado". **D** Enriquecimiento en bacterias reductoras de sulfatos en el "dispositivo doble de SÖHNGEN". La botella II se llenó con medio con lactato-sulfato; al hacer pasar H_2 el líquido iba pasando a I (nivel punteado); durante los dos días de incubación a 30°C se consumió la mayor parte del H_2.

tos de la degradación incompleta de los hidratos de carbono, ácidos grasos, oxiácidos, alcoholes e hidrógeno de la fermentación. La gran mayoría del sulfuro de hidrógeno liberado en condiciones naturales hay que considerarlo como producto final de la respiración del sulfato. Las aguas contaminadas contienen de 10^4 hasta 10^6 desulfuricantes/ml, mientras que en los lodos se encuentran del orden de 10^7.

La mayoría de los **yacimientos de azufre** rentables (en Texas, Louisiana y Méjico) no son de origen volcánico, sino depósitos de azufre biógeno acumulados desde tiempos geológicos. La reducción de los sulfatos del mar con desperdicios orgánicos (aguas residuales) se debe a la transformación por *Desulfovibrio* del sulfuro de hidrógeno en azufre.

La **corrosión anaeróbica del hierro** determinada indirectamente por *Desulfovibrio* es de gran importancia económica. En un medio húmedo se da una polarización del hierro incluso cuando las condiciones ambientales son anaeróbicas:



(1) Oxidación del hierro:

$$4\ Fe + 8\ H^+ \longrightarrow 4\ Fe^{2+} + 4\ H_2$$

Normalmente la capa de H_2 protege al hierro de una descomposición posterior. No obstante, cuando se encuentran simultáneamente sulfato y desulfuricantes, tiene lugar una despolarización catódica, y el hierro es oxidado incluso en ausencia de oxígeno:

(2) Reducción de sulfato:

$$4\ H_2 + SO_4^{2-} \longrightarrow H_2S + 2\ H_2O + 2\ OH^-$$

(3) Precipitación del hierro:

$$4\ Fe^{2+} + H_2S + 2\ OH^- + 4\ H_2O \longrightarrow FeS + 3\ Fe(OH)_2 + 6\ H^+$$

Suma (1) a (3):

$$4\ Fe + SO_4^{2-} + 2\ H_2O + 2\ H^+ \longrightarrow FeS + 3\ Fe(OH)_2$$

Los deterioros producidos de este modo en las cañerías de hierro (pipe lines u oleoductos) son considerables. La capacidad de las bacterias desulfuricantes para poder utilizar los ácidos orgánicos, alcoholes, hidrógeno e incluso el hidrógeno formado en la polarización del hierro como dadores de hidrógeno, es la característica que se utiliza para su enriquecimiento (Fig. 9.4).

Desulfovibrio ha sido considerado también como el responsable del elevado contenido en sulfuro de hidrógeno de las capas profundas del mar Negro (por debajo de los 200 m) y de la precipitación del hierro determinante del color negro de este mar. Por último, el que las góndolas del canal Grande de Venecia estén pintadas de negro es una protección contra la decoloración de las pinturas, con metales pesados, determinada por el SH_2.

En la formación de sulfuro de hidrógeno en la panza de los rumiantes participa *Desulfotomaculum ruminis* (pág. 459).

9.3 Formación de sulfuro de hidrógeno por reducción del azufre

Se sabe desde hace mucho tiempo que si se añade flor de azufre a una suspensión de levaduras que esté fermentando azúcar, ésta se incorpora al "torbellino de las reacciones biológicas" y se produce sulfuro de hidrógeno. No hace mucho se ha descubierto que algunas bacterias pueden también utilizar el azufre elemental como aceptor de hidrógenos para un transporte de electrones anaeróbico y poder así crecer. Aquí el azufre es reducido a sulfuro de hidrógeno. Puede denominarse a este proceso como **"respiración de azufre"**.

Hasta ahora se ha caracterizado *Desulfuromonas acetoxidans*. Esta bacteria con un flagelo de inserción lateral puede enriquecerse y aislarse a partir de agua de mar en un medio mineral que contenga acetato y se le haya añadido flor de azufre bajo condiciones anaeróbicas. *D. acetoxidans* oxida el acetato o el etanol hasta anhídrido carbónico. *D. acetoxidans* se diferencia de la mayoría de las especies del género *Desulfovibrio* por su capacidad para reducir el azufre y por la oxidación total de los sustratos orgánicos. Los demás pueden reducir sulfato o sulfito, pero no azufre, y p. ej., el lactato únicamente lo pueden oxidar formando acetato. *D. acetoxidans* contiene un citocromo c_7 de un potencial redox bajo y una proteína 4Fe-4S. Dispone de los enzimas del ciclo de los ácidos tricarboxílicos.

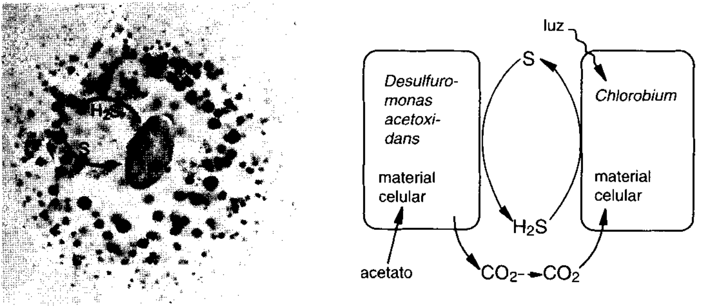


Fig. 9.5 Cultivo mixto de una bacteria reductora del azufre (*Desulfuromonas acetoxidans*) y una bacteria fototrofa verde (Chlorobiaceae) sobre un medio de cultivo con agar. En la gran colonia central de *Desulfuromonas acetoxidans* se oxida el acetato y se reduce el azufre. El sulfuro de hidrógeno difunde al entorno y es utilizado por las células de *Chlorobium* como dador de hidrógeno. El azufre excretado difunde, probablemente en forma de polisulfuro, hacia la colonia central, sirve de aceptor de hidrógenos y vuelve a ser reducido. La coexistencia de estas dos bacterias es un ejemplo perfecto de una asociación sintrófica con transferencia bidireccional de sustrato.

Esta bacteria puede vivir en una asociación sintrófica con bacterias verdes del azufre fototróficas, que oxidan al sulfuro de hidrógeno hasta azufre y fijan el anhídrido carbónico (Fig. 9.5).

Reducción de azufre por arqueobacterias. Varias bacterias termófilas extremas e hipertermófilas pertenecen al tipo metabólico de la respiración del azufre. La mayoría son acidófilos y anaeróbicos estrictos. Se aislaron recientemente a partir de sulfataras y fuentes termales. La bacteria *Pyrodictium* (*P. occultum, P. brockii*) crece hasta temperaturas de 110ºC, es anaeróbico estricto y crece autotróficamente con H_2 como dador y S^0 como aceptor de H, pero también puede crecer mixotróficamente. Especies de *Acidianus* (*A. brierleyi, A. ambivalens*) son bacterias sorprendentemente versátiles. Por una parte, crecen oxidando el S^o hasta sulfato aeróbicamente, y por otra, reducen al S^o hasta H_2S con H_2, pueden desarrollar por tanto anaeróbicamente una respiración de azufre.

9.4 Metanogénesis por reducción del carbonato

El metano se forma durante la degradación anaeróbica de la materia orgánica. Las cantidades son considerables; puede calcularse, no obstante, que del 1 al 1,5% de la materia orgánica que por mineralización vuelve al CO_2 atmosférico llega a la atmósfera pasando primero por metano y es allí donde pasa a CO y CO_2 a través de radicales hidroxilo (OH·). Los ecosistemas en los que se forma metano son las regiones de las grandes tundras y de los pantanos (de ahí el nombre de "gas de los pantanos"); arrozales; los sedimentos de lagos y lagunas; las zonas intermareales, salobrales y estuarios; los biodigestores de las depuradoras así como las panzas de más de 10^9 rumiantes. En los hábitats anaeróbicos la materia orgánica se fermenta primeramente a través de varios pasos intermedios hasta acetato, anhídrido carbónico e hidrógeno molecular. Estos productos de los descomponedores primarios y secundarios son los utilizados por las bacterias metanogénicas. Aproximadamente el 70% del metano formado procede del acetato, el 30% de $CO_2 + H_2$.

Situación sistemática. Por su forma pueden distinguirse bacterias metanogénicas bacilares (*Methanobacterium*), cocoidales (*Methanococcus*), sarcinas (*Methanosarcina*) y espiriladas (*Methanospirillum*).

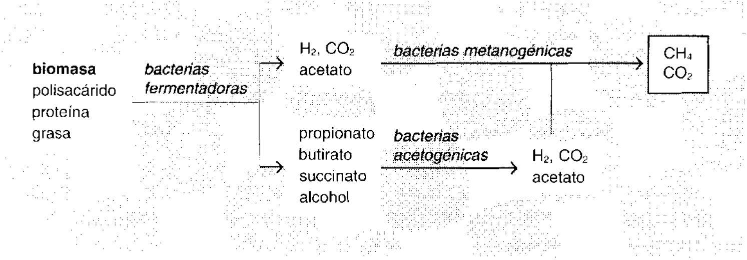
Las bacterias metanogénicas constituyen un grupo aparte; se diferencian de las demás bacterias no sólo por su tipo de fisiología, sino también por algunas características con relación a la composición de sus células. No se presenta ninguna estructura con el peptidoglucano típico: *Methanococcus* dispone exclusivamente de una cubierta proteica; *Methanospirillum* tiene una vaina polipeptídica; la pared celular de *Methanosarcina barkeri* está compuesta por un polisacárido, formado a base de ácidos urónicos, azúcares neutros y aminoazúcares. La penicilina no inhibe el crecimiento de las bacterias metanogénicas.

La membrana citoplasmática contiene grasas, éteres de la glicerina con hidrocarburos isoprenoides (pág. 115). Por su tamaño los ribosomas son sin embargo semejantes a los de las eubacterias (ribosomas 70S); no obstante las secuencias de bases de los RNA ribosómicos, sobre todo de los RNAr 16S se diferencian claramente. Desde el punto de vista de la secuencia de bases del RNAr 16S las bacterias metanogénicas se diferencian sustancialmente más de *E. coli*, por ejemplo, que de las cianobacterias. El mecanismo de traducción en los ribosomas es también insensible frente a los antibióticos que inhiben la síntesis proteica de las eubacterias. En base a éstas y a otras características diferenciales se tiende a reunir en un mismo grupo a las bacterias metanogénicas dentro de los procariotas en las arqueobacterias (apartado 3.13).

Fisiología. Las bacterias metanogénicas son anaeróbicas estrictas: el oxígeno atmosférico las mata. No contienen ni *catalasa* ni *superoxidodismutasa*. Esta elevada sensibilidad frente al oxígeno es el motivo de que los conocimientos fisiológicos, bioquímicos y ecológicos de este grupo sean aún muy escasos. En primer lugar tuvieron que desarrollarse métodos especiales, técnica de HUNGATE, que permitieran resembrar y aislar a las bacterias metanogénicas excluyendo el oxígeno.

La mayoría de las bacterias metanogénicas que se mantienen en cultivo axénico pueden utilizar el H_2 como dador de hidrógenos, algunas también el formiato, el metanol, el acetato o las metilaminas. En algunos ecosistemas anaeróbicos el acetato ha sido considerado como el sustrato principal de la metanogénesis. Por tanto, el espectro de sustratos es muy estrecho.

Las bacterias metanogénicas son el último eslabón de una **cadena alimenticia anaeróbica** (pág. 295), en cuyo inicio se encuentran los polisa-



cáridos (celulosa, almidón), las proteínas y las grasas, y en la que participan distintas bacterias fermentativas: 1. Bacterias que fermentan la celulosa a succinato, propionato, butirato, lactato, acetato, alcoholes, dióxido de carbono e hidrógeno. 2. Bacterias acetogénicas que fermentan estos productos primarios de la fermentación hasta acetato, formiato, dióxido de carbono e hidrógeno. Estos productos son utilizados como sustrato por las bacterias metanogénicas.

Las bacterias metanogénicas se encuentran en una estrecha relación con las bacterias productoras de hidrógeno (Fig. 9.6). En los microhábitats el hidrógeno casi no se encuentra libre en forma gaseosa. El hidrógeno liberado y disuelto en el medio es más bien captado inmediatamente por las metanogénicas. Es conocido que una presión parcial de hidrógeno elevada inhibe el metabolismo y el crecimiento de varias bacterias productoras de hidrógeno. Esto indica que no sólo las bacterias metanogénicas dependen de las productoras de H_2, sino que también los productores de H_2 dependen de las metanogénicas consumidoras de hidrógeno. Se da por tanto una asociación en el sentido de una simbiosis mutualista.

Las bacterias metanogénicas son capaces de activar el hidrógeno y de acoplar la oxidación del hidrógeno a la reducción del anhídrido carbónico. Como la sustancia celular puede sintetizarse exclusivamente a partir del anhídrido carbónico como única fuente de carbono, su tipo metabólico hay que considerarlo como quimioautótrofo. Para la obtención de energía se utiliza el CO_2 como aceptor de hidrógenos y se produce metano.

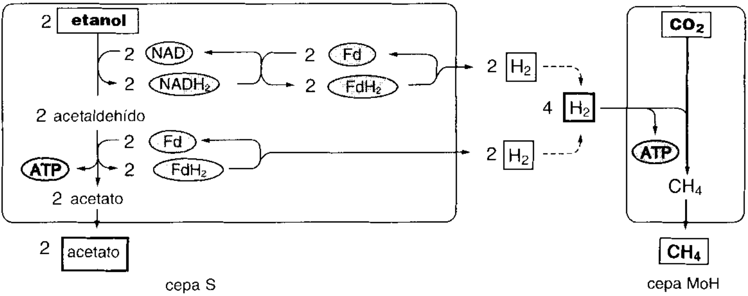
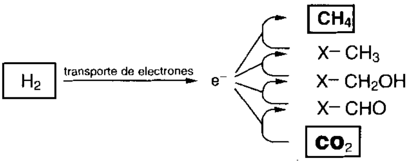


Fig. 9.6 Transferencia de hidrógeno entre dos especies bacterianas distintas. Se representa en el ejemplo de los componentes del cultivo de *Methanobacterium omelianskii.* El cultivo de estas bacterias se consideró durante 30 años como un cultivo puro, y hasta 1967 no se separaron la cepa MoH (Methanobacterium oxidizing hydrogen) de la bacteria acompañante S.



Por ello existe una justificación analógica al hablar de la metanogénesis como de una "**respiración de carbonatos**". Las metanogénicas se caracterizan por ello también como bacterias anaeróbicas, autótrofas y oxidadoras del hidrógeno.

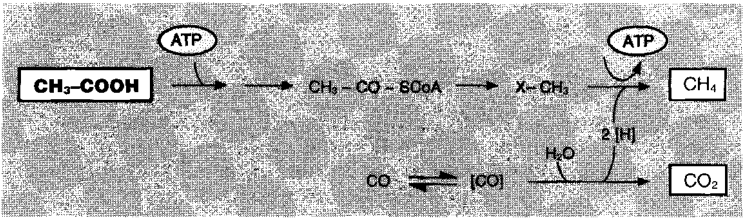
$$4\,H_2 + CO_2 \longrightarrow CH_4 + 2\,H_2O; \qquad \Delta G_0 = -\,131\ \text{kJ/mol}\ CO_2\ (-\,31{,}3\ \text{kcal/mol}\ CO_2)$$

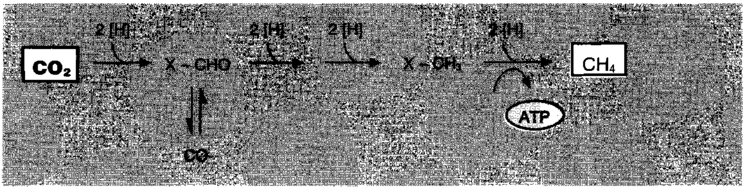
Algunas bacterias metanogénicas pueden también transformar el monóxido de carbono a metano. Como intermediarios se forman anhídrido carbónico e hidrógeno:

$$\begin{array}{lcl} 4\,CO + 4\,H_2O & \longrightarrow & 4\,CO_2 + 4\,H_2 \\ CO_2 + 4\,H_2 & \longrightarrow & CH_4 + 2\,H_2O \\ \hline 4\,CO + 2\,H_2O & \longrightarrow & CH_4 + 3\,CO_2 \end{array}$$

Bioquímica de la metanogénesis y ganancia energética. En las transformaciones boquímicas del H_2 y del CO_2 hasta el metano, o del acetato a metano y CO_2, están implicados una serie de coenzimas y grupos prostéticos que hasta ahora sólo se han encontrado en las bacterias metanogénicas: el derivado de la deazariboflavina F_{420}, metanopterina, metanofurano, el tetrapirrol de níquel factor F_{430}, el coenzima M (mercaptoetanosulfonato) y el HS-HTP (7-mercaptoheptanoil-treonil-fosfato). Las estructuras básicas se indican en la figura 9.7.

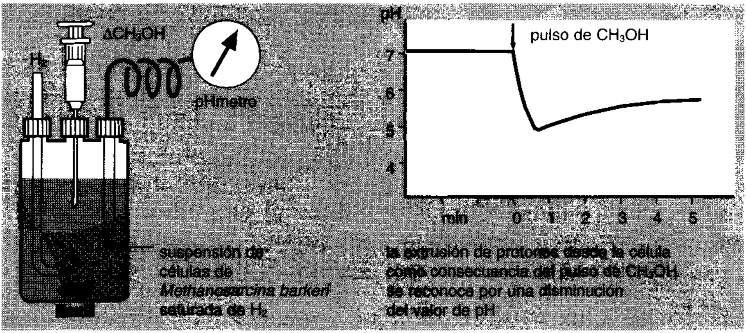
Las vías probables de formación de metano a partir de acetato y de $CO_2 + H_2$ se indican en los dos esquemas siguientes.





Aún se sabe muy poco de los enzimas implicados en los pasos de reacción. La cuestión acerca de la regeneración de ATP tampoco está totalmente aclarada. Desde el punto de vista termodinámico, únicamente el último paso de la metanogénesis tiene la posibilidad de regenerar ATP. Experimentos con *Methanosarcina barkeri*, que también puede formar metano a partir de metanol y H_2 ($CH_3OH + H_2 \longrightarrow CH_4 + H_2O$) han conducido a resultados concluyentes. La adición de ambos sustratos a suspensiones bacterianas condujo a una extrusión de protones, formación de ATP y metanogénesis.

Generalizando, estos resultados indican que las bacterias metanogénicas regeneran el ATP a través de una fosforilación en un transporte de electrones en condiciones anaeróbicas ("respiración anaeróbica") y no por una fosforilación de sustrato.



suspensión de células de *Methanosarcina barkeri* saturada de H_2

la extrusión de protones desde la célula como consecuencia del pulso de CH_3OH se reconoce por una disminución del valor de pH

Desde el punto de vista de la ganancia energética el punto más importante es el último paso de la metanogénesis, que conlleva una extrusión de protones. Se realiza gracias a un complejo enzimático, la *metil-coenzima M-metil-reductasa.* El enzima está compuesto por tres subunidades proteicas y se une como grupo prostético al tetrapirrol factor F_{430}. El enzima reduce al metil-coenzima M (CH_3-S-CoM) con HS-HTP como dador de H hasta metano y se forma como producto secundario CoM-S-S-HTP. Este último se rompe de forma reductiva en CoM-SH y en HS-HTP; los equi-

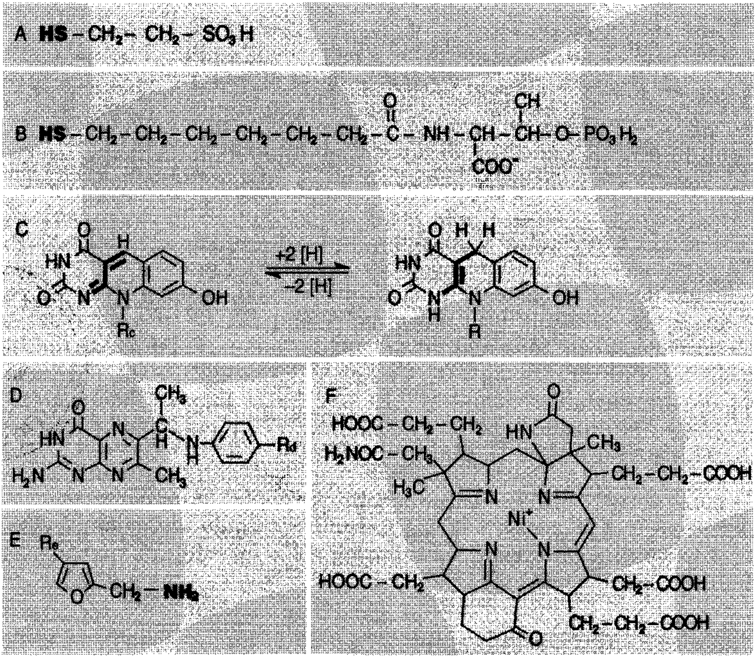
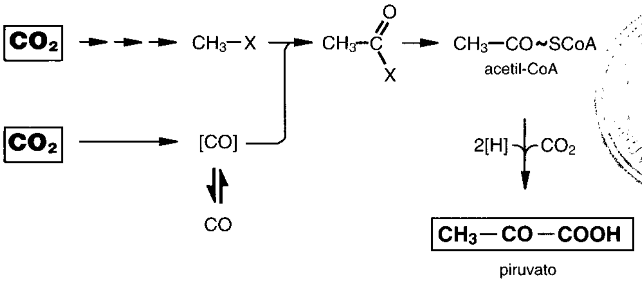

A HS - CH₂ - CH₂ - SO₃H
B HS - CH₂ - CH₂ - CH₂ - CH₂ - CH₂ - CH₂ - C - NH - CH - CH - O - PO₃H₂
O
CH
COO⁻
C
HN
O
N
H
OH
Rc
+2 [H]
-2 [H]
R
D
CH₃
Rd
H₂N
E
Re
CH₂ - NH₂
F
HOOC - CH₂ - CH₂
H₂NOC - CH₂
H₃C
CH₂ - CH₂ - COOH
Ni⁺
HOOC - CH₂
CH₂ - COOH
CH₂ - CH₂ - COOH

Fig. 9.7 Coenzimas y grupos prostéticos de las bacterias metanogénicas. A Coenzima M, **B** HS-HTP, **C** F_{420}, derivado de la deazarriboflavina, **D** metanopterina, **E** metanofurano, **F** factor F_{430}, tras la disociación de la *metil-coenzima M-metil-reductasa*. Los grupos reactivos de los compuestos D y F no están indicados. $R_{c\text{-}e}$: cadenas laterales diferentes, compuestas por varios componentes

valentes de reducción necesarios los suministra en el experimento indicado anteriormente el H_2 activado por una *hidrogenasa*.

Asimilación autotrófica del CO_2: vía reductiva del acetil-CoA. En la fijación autotrófica del CO_2 de las bacterias metanogénicas (al igual que las bacterias reductoras de sulfatos –véase apartado 9.2– y las acetogénicas –véase apartado 9.5– anaeróbicas utilizadoras del hidrógeno) no participan las reacciones del ciclo de la ribulosabifosfato. La síntesis del material celular a partir del CO_2 discurre por la vía reductiva del acetil-CoA. Las transformaciones implicadas se han demostrado mediante experimentos con compuestos radioactivos y también por estudios enzimáticos con *Methanobacterium thermoautotrophicum*; acerca de los mecanismos se está trabajando intensamente en la actualidad.

El anhídrido carbónico se reduce al nivel del metanol (en forma ligada). Una segunda molécula de CO_2 se reduce a CO mediante la *anhídrido carbónico-deshidrogenasa*. El potencial reductor se suministra por activación de H_2 mediante hidrogenasas y se transfiere mediante enzimas, que reaccionan con el factor F_{420} o el NADP. La carbonilación del metil-X conduce a acetil-X y la carboxilación reductiva del acetil-CoA por la *piruvato-sintasa* conduce a piruvato, a partir del cual se sintetizan las sustancias celulares según las vías ya conocidas.



Aplicación. Los biodigestores para la degradación anaeróbica de la materia orgánica de las aguas residuales urbanas forman parte de las **depuradoras** habituales. En los países industrializados la digestión de los lodos sirve en primer lugar para la estabilización de los lodos primarios y de los lodos activos que participan en la fase aeróbica de la depuración. El metano originado se emplea únicamente de forma parcial, se "quema". En agricultura se emplean fermentadores de biogás para fermentar excrementos de animales –conjuntamente con los residuos que contienen celulosa–. El método del biogás presenta la ventaja de que por una parte se mantienen las características como abono de los excrementos ricos en nitrógeno y, por otra parte, se forma biogás (metano) que puede ser utilizado en la economía doméstica y en los trabajos agrícolas como fuente de energía.

9.5 Formación de acetato por reducción del carbonato

En distintos hábitats, donde se forma metano, también puede formarse ácido acético. En la acidificación de los biodigestores de las depuradoras participan probablemente también bacterias, que transforman al anhídrido carbónico y al hidrógeno molecular según la siguiente ecuación:

$$4\,H_2 + 2\,CO_2 \rightarrow CH_3\text{–}COOH + 2\,H_2O; \qquad \Delta G_0' = -\,111\ \text{kJ/mol acetato}$$
$$(= -\,26{,}6\ \text{kcal/mol acetato})$$

Por enriquecimiento en un medio de cultivo que contenía únicamente las sales inorgánicas y las vitaminas necesarias aireadas con una mezcla de H_2 y CO_2, han podido aislarse hasta el momento de los lodos de depuradoras o de los lodos de hábitats acuáticos y de sedimentos marinos dos tipos de bacterias capaces de crecer oxidando el hidrógeno con CO_2 como único aceptor de hidrógenos. Se trata de bacterias bacilares, Gram positivas, *Clostridium aceticum*, *C. thermoaceticum* y *Acetobacterium woodii* (apartado 8.6). Ya que estas bacterias son capaces de sintetizar su material celular a partir del CO_2 como única fuente de carbono deben considerarse como autótrofas. Como además son capaces de crecer con H_2 como único dador de hidrógenos, su tipo de nutrición es quimiolitoautótrofo. Las bacterias acetogénicas deben considerarse, por tanto, como bacterias anaeróbicas quimiolitoautótrofas oxidadoras del hidrógeno, que obtienen su energía metabólica a través de una "respiración anaeróbica", **"respiración del carbonato"**. La síntesis del material celular discurre a través de acetil-CoA y piruvato. En esta síntesis asimilatoria de acético se reduce el anhídrido carbónico a través del formiato con ácido tetrahidrofólico como coenzima hasta metil-FH_4. El resto de las transformaciones son probablemente similares a la vía de la síntesis de acetato por *Methanobacterium thermoautotrophicum*. La carboxilación reductiva del acetil-CoA conduce a piruvato, a partir del cual se pueden sintetizar los materiales celulares.

Los respiradores de carbonatos liberan durante el crecimiento sobre H_2 + CO_2 grandes cantidades de acetato. Hay que considerar que la síntesis de acetato transcurre por las vías de la síntesis asimilatoria del acetato, y que el enlace rico en energía del acetil-CoA se utiliza para la regeneración de ATP. Las transformaciones aún no se han aclarado en todas las bacterias y aún quedan puntos por aclarar.

Se han aislado recientemente eubacterias anaeróbicas estrictas de fuentes termales, capaces de crecer en medio mineral bajo una atmósfera de monóxido de carbono puro. Forman hidrógeno y

$$CO + H_2O \longrightarrow CO_2 + H_2; \quad \Delta G_0' = -20 \text{ kJ/mol}$$

anhídrido carbónico como únicos productos metabólicos, y sintetizan su material celular probablemente también a través de la vía reductiva del acetil-CoA.

9.6 Formación de succinato por reducción del fumarato

El succinato ha sido presentado anteriormente varias veces como un producto de los procesos fermentativos, aunque sin indicar que la formación de succinato puede ir acoplada a una fosforilación en el transporte de electrones. El succinato es el producto de la reducción del fumarato:

2 [H] + fumarato $\longrightarrow$ succinato

La función del fumarato no es sólo la de un simple aceptor del poder reductor liberado en la descomposición inicial de la hexosa ($NADH_2$). El fumarato tiene un potencial redox relativamente positivo; para fumarato/succinato supone un E_0' = – 30 mV. Puede aceptar electrones, transferidos por coenzimas transportadores de hidrógeno, que hayan pasado parcialmente por la cadena transportadora de electrones. El fumarato posibilita por tanto una fosforilación en el transporte de electrones; puede considerarse la fosforilación en el transporte de electrones con fumarato como aceptor terminal de electrones como un proceso de respiración anaeróbica y hablar de una "**respiración del fumarato**" (Fig. 9.8).

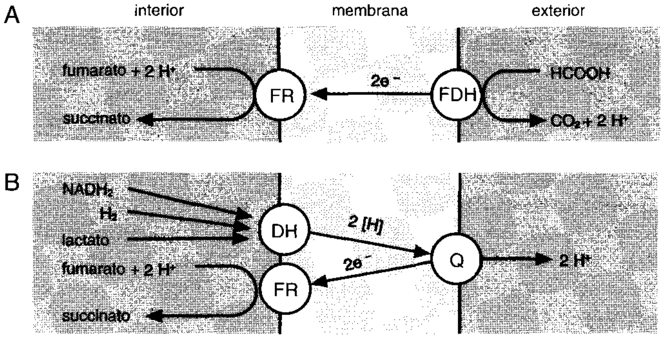


Fig. 9.8 Formación de succinato a partir del fumarato por la *fumarato-reductasa* ligada a membranas. Los electrones necesarios para la reducción del fumarato por la *fumarato-reductasa* (FR) pueden ser suministrados por (**A**) oxidación del formiato por la *formiato-deshidrogenasa* (FDH) hasta CO_2, o (**B**) por oxidación del $NADH_2$, H_2 o lactato por las *deshidrogenasas* (DH) respectivas. Ambas reacciones conducen a la formación de un potencial de protones en la membrana citoplasmática y permiten una fosforilación en el transporte de electrones.

De hecho la "respiración del fumarato" está muy extendida entre las bacterias quimiorganotrofas anaeróbicas. El enriquecimiento en fumarato de los medios de cultivo tiene como consecuencia para muchas bacterias un crecimiento más rápido y unos rendimientos celulares más efectivos. Esto indica que el fumarato posibilita una regeneración más efectiva del ATP. Se dispone de evidencias dentro de las enterobacterias (*Escherichia*, *Proteus*, *Salmonella*, *Klebsiella*) y para *Bacteroides*, *Propionibacterium* y

Wolinella succinogenes (Fig. 8.8 con *R. albus*). El fumarato puede ser suministrado bajo condiciones anaeróbicas a las bacterias en medio de cultivo como un aceptor terminal de electrones exógeno; no obstante, puede formarse también de forma endógena a partir de los hidratos de carbono y otras muchas sustancias a través del oxalacetato y el malato (Fig. 7.14).

La localización de la *fumarato-reductasa* en la célula está de acuerdo con su función en un proceso de transporte de electrones. El enzima va ligado a membranas. La reducción del fumarato es un proceso que consume protones.

La suposición de que la reducción del fumarato va ligada al establecimiento de un potencial de protones (positivo externamente) supone que el enzima esté localizado en la parte interna de la membrana. Esto es muy probablemente lo que sucede. Las medidas han indicado que en la reducción de 1 mol de fumarato se regenera aproximadamente 1 mol de ATP.

Se puede aceptar que en la mayoría de los procesos fermentativos que conllevan una formación de succinato participa la *fumarato-reductasa* y así se consigue una ganancia adicional de ATP.

Tal como se ha indicado anteriormente la *fumarato-reductasa* participa también en procesos fermentativos, por ejemplo en la formación de succinato por *Escherichia coli*, o en la formación de propionato por *Propionibacterium*. El significado de la "respiración de fumarato" va más allá del reino de los procariotas. Existen bastantes helmintos anaeróbicos facultativos (*Ascaris lumbricoides*, *Fasciola hepatica*, *Trichuris vulpis*, *Arenicola marina*), capaces de vivir en condiciones anaeróbicas. Estos organismos excretan succinato y propionato; la formación de propionato discurre a través de la vía del metil-malonil-CoA (Fig. 8.3). La formación de succinato y propionato tiene en los animales inferiores, aparentemente, un papel semejante al de la fermentación láctica en el músculo de los mamíferos. Las fermentaciones y la "respiración de fumarato" permiten una ganancia energética discreta incluso en los organismos aeróbicos estrictos, proporcionando así una tolerancia frente a las anoxias pasajeras.

9.7 Reducción de los iones hierro (III) a hierro (II)

Los iones hierro (III) pueden ser oxidados a hierro (II) por poblaciones mixtas de bacterias del suelo bajo condiciones anaeróbicas. Si junto a los iones de hierro (III) se encuentran también iones nitrato o nitrito, éstos se reducirán inicialmente a nitrito y nitrógeno (desnitrificación), y a continuación tendrá lugar la reducción del hierro (III). Se acepta que la *nitrato-reductasa* es la que transfiere los electrones al hierro (III). Como la reducción del nitrato va acoplada a una fosforilación en el transporte de electrones parece posible que también en la reducción del hierro (III) se dé una **"respiración anaeróbica"**. El potencial redox E_0' de 770 mV para el Fe^{3+}/Fe^{2+} hace pensar que la reacción sea termodinámicamente posible. Recientemente se ha descubierto efectivamente una bacteria reductora del hierro. En ausencia de oxígeno esta cepa bacteriana GS15 (*Alteromonas*) utiliza acetato como fuente de C y dador de H, y el hierro III como aceptor de H. En la reducción del hierro férrico por el acetato se forma una mezcla de Fe^{2+} y Fe^{3+} que se almacena como óxido de hierro II y III Fe_3O_4 (= magnetita) que es ferromagnético. Los productos metabólicos de los reductores de hierro se demuestran por ello mediante un imán. Como los óxidos férricos son prácticamente insolubles y tienen que transformarse por las bacterias a formas solubles y permeables a la célula –probablemente mediante sideróforos– el crecimiento bajo estas condiciones es lento y escaso.

10. Oxidaciones incompletas y biotecnología microbiana

Al considerar los procesos bioquímicos se indicó ya que frente a las fermentaciones clásicas, que se desarrollan bajo condiciones anaeróbicas (Cap. 8) se dan también fermentaciones que tienen lugar con suministro de oxígeno y que se denominan **"fermentaciones oxidativas"** u **"oxidaciones incompletas"**. Entre los productos finales de estos procesos se cuentan el ácido acético, ácido glucónico, cetoácidos, oxoácidos, ácido fumárico, ácido cítrico, ácido glutámico y otros. En los últimos cincuenta años ha aumentado significativamente el número de productos obtenidos por vía aeróbica con ayuda de los microorganismos, y la mayoría de las fermentaciones industriales son aeróbicas. Por ello, en el presente capítulo no nos ocuparemos tan sólo de las "fermentaciones oxidativas" en sentido estricto, sino también de los microorganismos y procesos que se emplean en la **"Microbiología industrial"** (actualmente llamada **Biotecnología microbiana**). Los procesos ya introducidos en el capítulo 8 no los repetiremos.

La nueva denominación de "Biotecnología microbiana" hace referencia a un nuevo contenido. Los microorganismos utilizados hasta ahora en la producción microbiológica eran cepas naturales o seleccionadas por mutación. Pero ya actualmente, y en el futuro, se emplearán microorganismos que habrán sido modificados mucho más profundamente desde el punto de vista genético molecular. Los métodos de la ingeniería genética (apartado 15.5 y Cap. 16) permiten producir por vía microbiana nuevos metabolitos, productos secundarios naturales y nuevas proteínas (insulina, somatostatina, entre otros).

10.1 Formación de acético y bacterias del ácido acético

Las bacterias del ácido acético tienen en común la capacidad de formar ácidos a partir de azúcares o alcoholes a través de oxidaciones incompletas, y de secretarlos transitoriamente, o como productos finales desechables, al medio de cultivo. Entre las bacterias del ácido acético se cuentan bacilos Gram negativos, débilmente móviles por flagelación peritrica (*Acetobacter*) o flagelación polar (*Acetomonas* = *Gluconobacter*). Son muy semejantes a los pseudomonas, pero se diferencian de ellos por su elevada tolerancia frente a los ácidos, una actividad peptolítica disminuida, poca motilidad y por la ausencia de pigmentos coloreados. Los hábitats naturales de las bacterias del ácido acético son las plantas. Allí donde se liberen zumos ricos en azúcares se encuentran levaduras conjuntamente con bacterias del ácido acético.

El que una bacteria pertenezca al grupo de los superoxidantes (*peroxydans*), que acumula el acetato únicamente de forma transitoria, o que pertenezca al grupo *suboxydans*, incapaz de oxidar al acetato, puede demostrarse ya con experimentos muy sencillos. Sobre un medio lechoso de agar-yeso (etanol-extracto de levadura-carbonato cálcico) tiene lugar durante el crecimiento de las colonias una excreción de ácidos que conduce a la disolución del carbonato cálcico (formación de un halo). Mientras que los del grupo **suboxydans** dejan un halo claro permanentemente, los del grupo **peroxydans** determinan una nueva aparición de turbidez por precipitación del carbonato cálcico cuando oxidan de nuevo el acetato. Entre los del grupo peroxidans se cuentan *Acetobacter aceti* y *A. pasteurianum. Gluconobacter oxydans* es el prototipo de los suboxidantes. Entre los dos grupos se dan todas las transiciones posibles. *Acetobacter xylinum*, *A. aceti* y *A. acidophilum* oxidan el acetato únicamente muy despacio. La mayoría de las bacterias del ácido acético requieren medios nutritivos complejos.

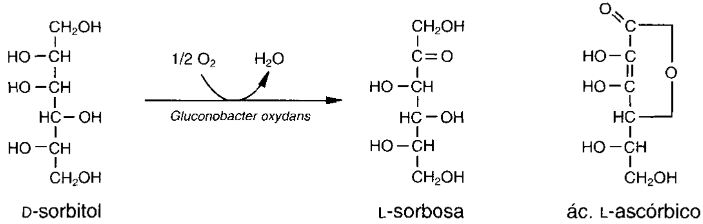
Las bacterias del ácido acético oxidan alcoholes primarios hasta los ácidos grasos correspondientes, p. ej.

$$CH_3\text{–}CH_2OH \longrightarrow CH_3\text{–}COOH$$
$$CH_3\text{–}CH_2\text{–}CH_2OH \longrightarrow CH_3\text{–}CH_2\text{–}COOH$$

alcoholes secundarios a cetonas, p. ej.

$$CH_3\text{–}CHOH\text{–}CH_3 \longrightarrow CH_3\text{–}CO\text{–}CH_3$$
$$CH_2OH\text{–}CHOH\text{–}CH_2OH \longrightarrow CH_2OH\text{–}CO\text{–}CH_2OH$$

Y los alcoholes de los azúcares a aldosas y cetosas, por ejemplo sorbitol a sorbosa. Esta oxidación ha alcanzado una gran importancia técnica como una de las reacciones parciales en la vía de la preparación de la glucosa para transformarla en ácido ascórbico. El D-sorbitol puede formarse por reducción electrolítica de la D-glucosa. *G. oxydans* transforma con un rendimiento del 90% disoluciones que contengan un 30% de sorbitol a sorbosa. Al igual que el sorbitol se oxidan también la glicerina o polialcoholes de cuatro, cinco, seis o siete carbonos (p. ej. D-manitol a D-fructosa).



Los aldehídos, las aldosas y las cetosas a los ácidos correspondientes, por ejemplo

aldehído glicólico ⟶ glicolato
L-xilosa ⟶ L-xilonato
D-glucosa ⟶ D-gluconato

D-gluconato a cetogluconatos: las distintas cepas de las bacterias del ácido acético se diferencian entre sí por la capacidad de formar o bien 2- o 5-cetogluconato. *Gluconobacter melanogenum* produce el 2,5-dicetogluconato a través del 2-cetogluconato. Este ácido es inestable a un valor de pH de 4,5 y se cree que es el responsable de la coloración pardonegruzca de las colonias de *G. melanogenum* (¡nombre!) sobre placas de agar glucosado.

Tecnología de la producción de vinagre. La obtención del vinagre a partir del vino o bien del etanol es un problema predominantemente de la técnica de aireación (pág. 199). Los procedimientos técnicos se encaminan siempre a mantener a las bacterias y al líquido que debe oxidarse en un contacto intenso con el oxígeno del aire. Según el principio se distinguen tres procedimientos: el procedimiento de superficie o de bandejas, el de inmovilización y el procedimiento sumergido.

El **proceso en superficie** es muy antiguo y se estandarizó como **proceso de Orleans**. Si el vino se coloca en bandejas planas y las moscas del vinagre (*Drosophila*) se encargan de inocularlo, se forma sobre la superficie una película continua, una cubierta, que se denomina también "madre del vinagre" o *mycoderma aceti*. Está compuesta por células de *Acetobacter xylinum* que se mantienen juntas mediante fibrillas de celulosa (inmovilizadas). El proceso de acidificación es muy lento. El proceso se emplea también para la producción doméstica. Con la denominación de **procesos de inmovilización** se agrupan a todos aquellos en los que las bacterias están fijadas sobre un material de soporte (orujo y zarcillos en cubas aireadas y agitadas). En el "proceso de acidificación rápida" el líquido con alcohol se conduce varias veces a través de contenedores rellenos con virutas de haya. La "columna bacteriana" se airea desde abajo. El proceso tiene la ventaja de que el vinagre para alimentación no requiere prácticamente ninguna filtración, ya que las bacterias están "inmovilizadas". Contenedores de hace 50 años siguen funcionando actualmente sin modificación. A pesar de ello, se implantan los **procesos sumergidos** para la producción de acético. Se utilizan fermentadores, que permiten una fuerte aireación y disipación de temperatura.

Bioquímica de la formación de acético. *Acetobacter* y *Gluconobacter* tienen *alcohol-*, *glucosa-* y otras *poliol-deshidrogenasas* que contienen un grupo prostético descubierto hace poco, llamado metoxantina o pirroloquinolinquinona (PQQ) (Fig. 7.2). Estos enzimas están localizados en la parte externa de la membrana citoplasmática y catalizan la oxidación de etanol, glicerina o glucosa a los ácidos correspondientes (acético, glicérico o glucónico). Los electrones se transfieren a la cadena transportadora y se ceden protones al exterior en el espacio periplásmico. La metoxantina también llega al medio de cultivo y al vinagre.

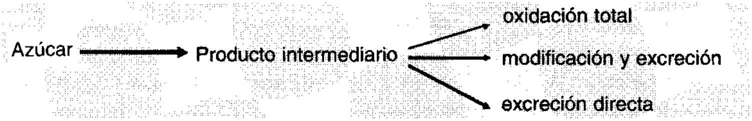
10.2 Producción de otros ácidos orgánicos

Muchos ácidos orgánicos se obtienen a escala industrial mediante oxidaciones incompletas con la ayuda de hongos. Las ventajas de la utilización de hongos para la obtención de ácido cítrico, ácido itacónico, ácido glucónico, ácido málico, etc., se pusieron en evidencia hace mucho tiempo. Se basan sobre todo en la fácil separación de los organismos a partir del caldo de cultivo. Mientras que para separar bacterias hacen falta centrífugas y costos energéticos elevados, para la separación de las levaduras y otros hongos bastan procesos de filtración baratos.

10.2.1 Fisiología y biotecnología

El metabolismo de los hongos es oxidativo estricto. Esto no significa que los hongos no degraden anaeróbicamente los hidratos de carbono ni que no los puedan fermentar (¡fermentación de las levaduras!); no obstante bajo condiciones anaeróbicas no se produce un crecimiento significativo y los productos de fermentación son principalmente el etanol y el ácido láctico. Otros ácidos orgánicos se producen exclusivamente bajo condiciones aeróbicas.

En los hábitats naturales de los hongos, el suelo, no tiene lugar nunca una excreción significativa de productos intermediarios. Cuando hay deficiencias en los nutrientes los hongos obtienen un máximo de energía y de sustancia celular gracias a las oxidaciones completas y la asimilación del sustrato. El que en el laboratorio y en la práctica industrial se dé una excreción de numerosos productos metabólicos se debe a un exceso en la oferta de hidratos de carbono y a una cierta "desorganización" metabólica debida frecuentemente a la captación de oligoelementos. Los hongos tienen un "sistema glucolítico activo". En los cuellos de botella de los intermediarios metabólicos tiene lugar una acumulación de productos intermediarios, que son excretados directamente o bien después de unas pequeñas modificaciones. J.W. Foster habló de un "metabolismo excesivo". En último término la mayoría de las "fermentaciones oxidativas" pueden considerarse debidas a un fallo en la regulación del metabolismo.

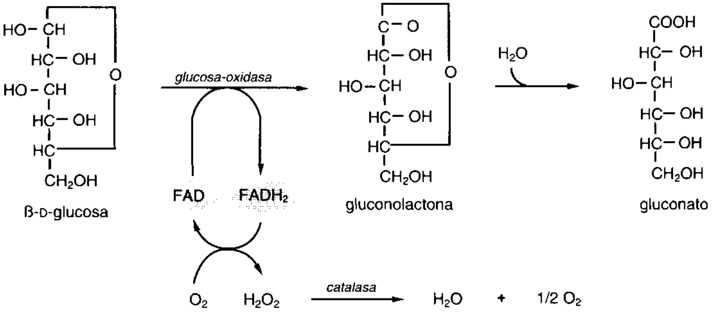


En muchos casos basta con eliminar un oligoelemento esencial, para que un hongo inicie la acumulación de productos intermediarios en el medio. Una acción significativa la tienen el zinc, el hierro, el manganeso y el cobre, así como el magnesio, el calcio y el potasio (Fig. 10.1).

El **ácido láctico** es excretado principalmente por mucorales (*Rhizopus nodosus*, *R. oryzae*, *R. arrhizus*, *R. nigricans*) y otros ficomicetos (*Allomyces*, *Saprolegnia*, *Blastocladiella*). No es el único producto metabólico como en las bacterias lácticas homofermentativas; junto al ácido láctico aparecen también algunas cantidades de ácido fumárico, ácido pirúvico, ácido malónico, ácido fórmico, ácido acético y etanol. Los rendimientos máximos en ácido láctico tienen lugar en presencia de oxígeno. Como los hongos no requieren unos medios de cultivo complejos y tienen suficiente con la urea como fuente de nitrógeno, la obtención de ácido láctico en una forma especialmente pura presenta menos dificultades que en el caso de la fermentación láctica por los lactobacilos.

La producción de **ácido fumárico** es una característica típica de varios géneros de mucorales (*Mucor*, *Cunninghamella*, *Circinella*, *Rhizopus*).

El **ácido glucónico** es sintetizado por muchos *Aspergillus* y *Penicillium*. La producción se basa en la oxidación enzimática de la glucosa por una *glucosa-oxidasa* excretada por los hongos al medio. *Aspergillus niger* lo realiza con gran eficacia incluso en disoluciones de glucosa del 30-35%, cuando el ácido va siendo neutralizado por carbonato cálcico.



La *glucosa-oxidasa* es un enzima que contiene al FAD como grupo prostético. En la oxidación de la glucosa se forma como producto primario de la oxidación ß-D-glucono-δ-lactona, que se transforma posteriormente de forma espontánea o enzimáticamente, por la *gluconolactonasa*, con captación de agua, hasta gluconato. La *glucosa-oxidasa* transporta el hidrógeno hasta el oxígeno atmosférico formando peróxido de hidrógeno, y se escinde en agua y oxígeno mediante la *catalasa*.

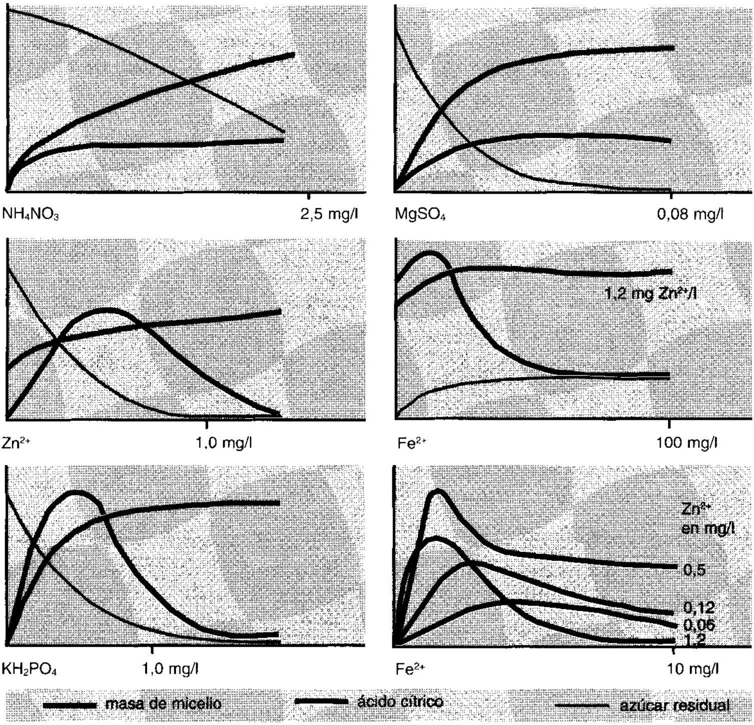


Fig. 10.1 Dependencia de la masa de micelio y de la cantidad de ácido cítrico producido con respecto a la composición del medio de cultivo en *Aspergillus niger* después de nueve días de crecimiento. El medio completo contiene los siguientes componentes (datos en g/l): glucosa 140; nitrógeno 1,05; KH_2PO_4 2,5; $MgSO_4{\cdot}7H_2O$ 0,5; hierro 0,01; zinc 0,0025; pH 3,8 (de Shu, P., M.J. Johnson: J. Bacteriol. 56 [1948] 577).

El **ácido oxálico** es excretado por muchos hongos. Su producción viene favorecida por un pH alcalino en el medio de cultivo.

Acerca de la **formación de ácido cítrico** por hongos se ha trabajado mucho, sobre todo bajo el aspecto práctico y económico. Después de que J.C. Wehmer descubriese el ácido cítrico en cultivos de penicilium (*Citromyces pfefferianus*) en 1893, Currie (1917) estableció las bases para la obtención industrial del ácido cítrico al descubrir, que *Aspergillus niger* crecía abundantemente en medios de cultivo con un pH inicial de 2,5 a 3,5 y que entonces excretaba grandes cantidades de ácido cítrico. Al ir aumentando el pH aparecían ácido glucónico y finalmente ácido oxálico. El bajo pH inicial tiene la ventaja de que prácticamente no hay que temer las contaminaciones bacterianas.

Ésta es la razón de que la producción industrial se hiciese sin tomar precauciones de esterilidad en el llamado "procedimiento superficial" en bandejas. Las cámaras de fermentación son recipientes de aluminio (2 × 2,5 × 0,15 m) que se llenan a una altura de 8 cm con una disolución de melazas, se inoculan e incuban de 9 a 11 días a 30°C. El rendimiento es alto. Puede eliminarse el medio de cultivo y el crecimiento de los hongos puede utilizarse de nuevo cubriéndolos con una disolución fresca. El ácido cítrico se recupera del medio transformado por precipitación con carbonato cálcico, se cristaliza y se libera mediante ácido sulfúrico. En los países industrializados la producción de ácido cítrico se hace exclusivamente por cultivos en profundidad. Se utilizan fermentadores de 300 000 hasta 400 000 litros de volumen sin peligros de contaminación. En lugar de melaza se emplea azúcar de caña.

Como ejemplo de la optimización de un medio de cultivo para favorecer la producción de un metabolito damos los datos de un estudio antiguo (Fig. 10.1).

La dependencia en la producción de ácido cítrico por *Aspergillus niger* con respecto a los componentes del medio de cultivo es especialmente significativa. Se pone claramente de manifiesto cuando se mantienen constantes todas las condiciones excepto un componente que se modifica cuantitativamente. Si se hace un medio de cultivo sencillo con glucosa, libre de cualquier oligoelemento por precipitación con hidróxido de aluminio, y se añaden los distintos componentes en concentraciones conocidas, se puede inocular y determinar al cabo de 9 días de agitación de los frascos de cultivo la masa miceliar, el azúcar residual y el ácido cítrico, obteniéndose entonces una serie de relaciones (Fig. 10.1). Las curvas de los diagramas permiten establecer: a) El nitrato amónico y el sulfato magnésico no tienen una influencia específica en el rendimiento en ácido cítrico; estas sales controlan el crecimiento del micelio. b) En la dependencia de la concentración en zinc, hierro y fósforo aparecen unas curvas de óptimo típicas. Si estos elementos permiten únicamente un crecimiento subóptimo se dan rendimientos superiores en ácido. Con concentraciones aún inferiores el crecimiento del micelio limita también la producción de ácido. c) Se obtienen rendimientos especialmente elevados cuando dos componentes, el hierro y el zinc, se encuentran en cantidades limitantes. El manganeso tiene una acción inhibitoria significativa; 3 µg Mn^{2+}/litro de medio de cultivo son suficientes para disminuir el rendimiento (¡la glucosa comercial purificada aportaría ya 10 µg Mn^{2+}/140 g de glucosa en 1 litro de cultivo!).

El que la deficiencia en hierro incremente la excreción de ácido cítrico se basa con toda probabilidad en que el hierro actúa como cofactor de la *aconitasa*. El cobre actúa sobre la *aconitasa* como un antagonista del hierro. En ello se basa una nueva intervención para incrementar el rendimiento en ácido cítrico. Incluso en presencia de pequeñas cantidades de iones de hierro en la disolución de melazas (10 mg/l) se obtienen rendimientos máximos cuando a la disolución se le añade un exceso en iones de cobre (150 mg/l).

El **ácido itacónico** es sintetizado tan sólo por unas pocas cepas de *Aspergillus itaconicus* y *A. terreus*. La producción de ácido itacónico tiene también lugar a pH en torno a 2.

10.2.2 Química de la producción de ácidos por hongos

No cabe ninguna duda de que en la formación de los ácidos excretados por los hongos durante la transformación de la glucosa participan reacciones del ciclo de los ácidos tricarboxílicos (ciclo "del ácido cítrico"). El malato, el fumarato, el succinato y el citrato se sintetizan por la vía del ciclo de los ácidos tricarboxílicos, y son excretados directamente (Fig. 10.2).

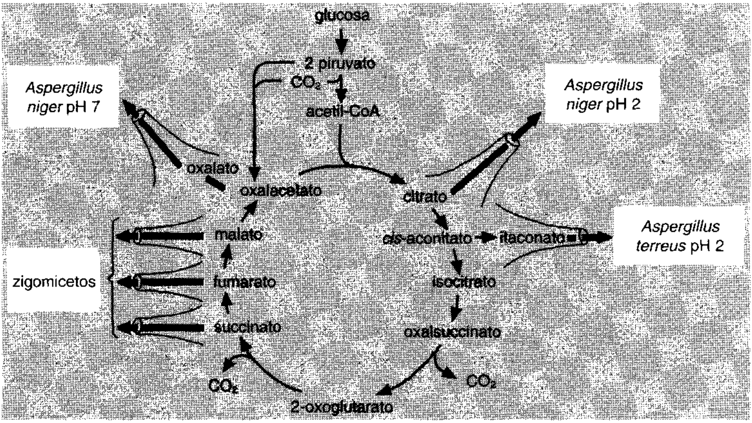
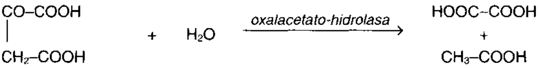

glucosa
2 piruvato
CO₂
acetil-CoA
Aspergillus niger pH 7
Aspergillus niger pH 2
oxalato
oxalacetato
citrato
malato
cis-aconitato
itaconato
Aspergillus terreus pH 2
zigomicetos
fumarato
isocitrato
succinato
oxalsuccinato
CO₂
CO₂
2-oxoglutarato

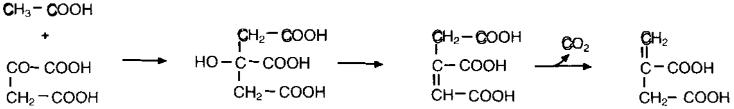
Fig. 10.2 Producción de ácidos orgánicos por hongos.

El **ácido oxálico** se forma por hidrólisis del oxalacetato mediante la *oxalacetato-hidrolasa*:



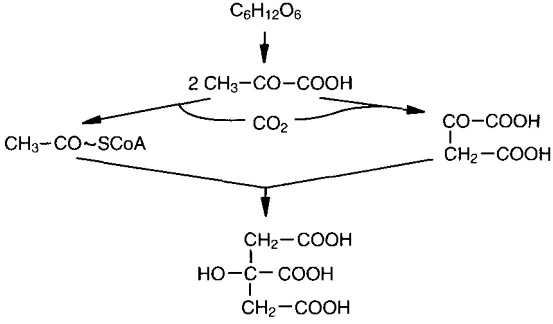
$$\begin{array}{l} CO{-}COOH \\ | \\ CH_2{-}COOH \end{array} + H_2O \xrightarrow{\text{oxalacetato-hidrolasa}} \begin{array}{c} HOOC{-}COOH \\ + \\ CH_3{-}COOH \end{array}$$

La formación de **ácido itacónico** parte del ácido *cis*-aconítico. Durante la descarboxilación tiene lugar un desplazamiento de electrones en el esqueleto carbonado, por lo que el doble enlace se desplaza de la posición 2,3 a la posición 3,4:



El ciclo de los ácidos tricarboxílicos tiene en primer lugar función degradativa. No obstante, hay que ver en él un "anillo de distribución" central, que proporciona los componentes previos de un gran número de constituyentes celulares. Si se captan productos intermediarios en algún punto del ciclo, otras reacciones deberán asegurar los suministros de oxalacetato. De las dos reacciones anapleróticas (Fig. 7.7, pág. 257 y 274), la transformación de isocitrato a través del glioxilato con el acetil-CoA hasta malato y succinato, y la carboxilación del piruvato hasta oxalacetato, la reacción de carboxilación es la más importante. El ciclo del glioxilato se utiliza en primer lugar para consumir acetato, ácidos grasos de cadena larga e hidrocarburos, pero también a otros sustratos que se degradan a través del acetil-CoA como producto intermediario. La glucosa reprime la síntesis de los enzimas clave del ciclo del glioxilato (*isocitrato-liasa* y *malato-sintasa*).

Si el **ácido cítrico** se sintetizase exclusivamente a partir del acetil-CoA, 1 mol de glucosa conduciría a la formación de por lo menos 2/3 de mol de citrato; esto es, a partir de 100 g de glucosa se formarían sólo 71,1 g de ácido cítrico. Sin embargo, ocasionalmente, se consiguen rendimientos de 75 y hasta 87 g de ácido cítrico. La comprobación ha permitido establecer que se fijan grandes cantidades de anhídrido carbónico. El $^{14}CO_2$ añadido se encuentra en el átomo de carbono 6 del ácido cítrico. La transformación de la glucosa hasta el ácido cítrico está representada en el siguiente esquema:

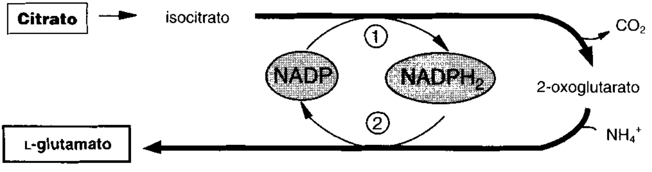


10.3 Producción de aminoácidos

Con el descubrimiento de *Corynebacterium glutamicum* por KINOSHITA (1957) se abrió una nueva época en el desarrollo de la utilización industrial de los procesos de oxidación incompleta. Esta bacteria excretora de ácido L-glutámico se aisló mediante una técnica de "screening" sencilla, el método "bioautográfico". Un gran número de bacterias del suelo se transfirió mediante calcos (pág. 495) sobre distintos medios de cultivo, se las dejó crecer y a continuación se mataron mediante radiaciones ultravioletas. Las placas se cubrieron con un medio basal en el que se había suspendido una cepa bacteriana auxotrófica para el ácido glutámico. Después de una nueva incubación, el crecimiento de esta bacteria indicadora señalaba aquellas colonias iniciales que habían excretado ácido glutámico.

El ácido L-glutámico se forma sólo bajo condiciones muy aeróbicas. Pruebas en fermentadores de 50 m^3 con medios de cultivo que contenían urea como fuente de nitrógeno y un 10% de glucosa, dieron al cabo de 40 horas a 30°C 50 g de L-glutamato/l, esto es, un rendimiento de 0,6 moles de glutamato por mol de glucosa.

La degradación de la glucosa tiene lugar aparentemente a través de la vía de la fructosabifosfato y a continuación a través del citrato, el 2-oxoglutarato hasta L-glutamato. En la formación de oxalacetato no participa el ciclo del glioxilato, sino una carboxilación del piruvato, al igual que en la formación de cítrico por *Aspergillus niger*. Prácticamente todo el CO_2 añadido al medio de cultivo se recupera en el grupo α-carboxílico del ácido glutámico. La excreción se basa aparentemente en una acumulación del 2-oxoglutarato como consecuencia de un defecto en la *2-oxoglutarato-deshidrogenasa*. En ausencia de amonio se excreta 2-oxoglutarato. En la producción industrial de glutamato se está añadiendo recientemente acetato en lugar de glucosa como sustrato.



Las cepas de *Corynebacterium glutamicum* y *Brevibacterium divaricatum* excretoras de ácido L-glutámico requieren biotina. La concentración de biotina en el medio de cultivo es de significación decisiva en la acumulación del ácido; 2,5 μg de biotina/litro de disolución son concentraciones óptimas. Si las concentraciones son inferiores el crecimiento es escaso; concentraciones superiores de biotina favorecen el crecimiento y reducen el rendimiento en ácido glutámico (Fig. 10.3).

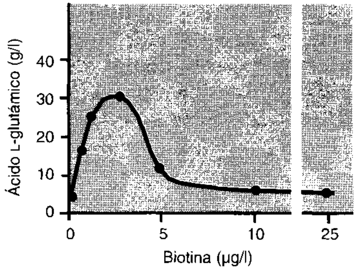


Fig.10.3 Dependencia de la formación de ácido L-glutámico en *Corynebacterium glutamicum* de la concentración de biotina del medio (de HUANG, H.T. en: Progr. industr. Microbiol., 5 [1964] 57).

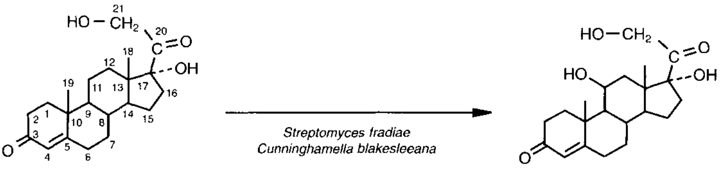
Para la producción de otros aminoácidos se pueden obtener mutantes auxotróficos de *Corynebacterium glutamicum*. Mutantes que requieran homoserina secretan en condiciones apropiadas 20 g de L-lisina/litro de medio de cultivo. Otros mutantes de *C. glutamicum*, de Enterobacteriáceas y Pseudomonadáceas producen L-homoserina, L-valina, L-isoleucina, L-triptófano, L-tirosina y otros aminoácidos.

En Japón se han desarrollado otros métodos para la obtención de ácido inosínico y de ácido guanílico. Estos nucleótidos 5' se utilizan como condimentos y para dar sabor.

10.4 Transformación de sustancias por los microorganismos

La elevada especificidad, así como el elevado rendimiento que se conseguía en las oxidaciones llevadas a cabo por las bacterias del ácido acético, y sus utilizaciones industriales, especialmente en la producción de sorbosa, despertó el interés a partir de los años treinta por el estudio de los microorganismos en lo referente a sus propiedades catalíticas en la transformación de productos naturales y también de sustancias, tanto celulares como no. Los microorganismos realizan sobre una gran cantidad de sustancias modificaciones altamente específicas: oxidaciones, hidrataciones, hidrólisis, esterificaciones, condensaciones, metilaciones, descarboxilaciones, deshidrogenaciones, desaminaciones, aminaciones, entre otras. Además estas transformaciones biológicas son estereoespecíficas. Estas transformaciones pueden ser realizadas tanto por actinomicetos y otras bacterias, como por hongos superiores e inferiores.

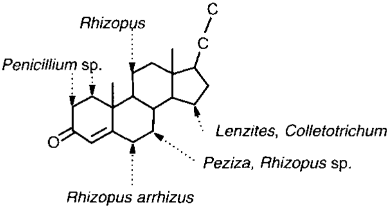
Éxitos especialmente importantes se han conseguido en la síntesis microbiana de esteroides. La síntesis química de la cortisona y de la hidrocortisona requiere más de 30 pasos, y discurre con un rendimiento inferior. Si intervienen microorganismos la cortisona puede conseguirse en 13 pasos. Uno de los puntos más difíciles en la síntesis es la introducción *de un* grupo hidroxilo en la posición 11 del esqueleto del esteroide. La realizan algunos hongos inferiores (*Rhizopus arrhizus*, *Curvularia lunata*, *Cunninghamella blakesleeana*) y *Streptomyces fradiae*. Daremos a continuación como ejemplo clásico la transformación del compuesto S de REICHSTEIN en hidrocortisona mediante una oxigenación específica.


21
HO – CH₂
20
C=O
18
12
··OH
19
11
13
17
16
2
1
10
9
8
14
15
3
5
7
O
4
6
Streptomyces fradiae
Cunninghamella blakesleeana
HO–CH₂
C=O
HO
··OH
O

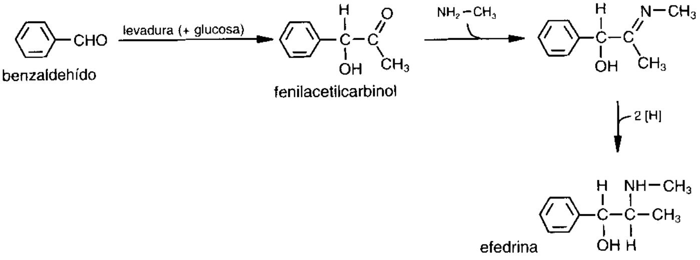
11-desoxicortisol
(compuesto S de Reichstein)

hidrocortisona
(= cortisol)

Junto a esta oxigenación, muchos hongos son capaces de hidroxilar estereospecíficamente mediante *oxigenasas* casi todos los puntos de la molécula del esteroide. Otras acciones enzimáticas microbianas afectan a la deshidrogenación de grupos hidroxilos alcohólicos, a la introducción de dobles enlaces, a reducción de grupos cetónicos y oxónicos, etc.


C
C
Rhizopus
Penicillium sp.
O
Lenzites, *Colletotrichum*
Peziza, *Rhizopus* sp.
Rhizopus arrhizus

Como ejemplo de una **reacción de adición** indicaremos la síntesis de fenilacetilcarbinol, un producto intermediario importante en la síntesis de la efedrina. El benzaldehído añadido a un cultivo en fermentación de levaduras queda acilado, aparentemente de la misma forma que en la formación de acetoína por las levaduras, por transferencia del "acetaldehído activo" (Fig. 7.6, pág. 256) al acetaldehído. Las transformaciones posteriores en el fenilacetilcarbinol son transformaciones químicas.

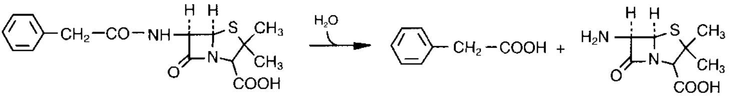

CHO
levadura (+ glucosa)
H
O
C
C
OH
CH₃
NH₂–CH₃
H
N–CH₃
C
C
OH
CH₃
2 [H]
H
NH–CH₃
C
C
CH₃
OH
H

benzaldehído

fenilacetilcarbinol

efedrina

La obtención del ácido 6-aminopenicilánico ofrece un ejemplo de la **escisión enzimática** de una sustancia con ayuda de microorganismos. Algunos hongos y bacterias que contienen una *acilasa* específica escinden a las penicilinas naturales, formando el ácido 6-aminopenicilánico, que es de nuevo un punto de partida para la obtención de penicilinas semisintéticas.



bencilpenicilina (penicilina G)

ác. 6-aminopenicilánico

10.5 Producción de antibióticos

El descubrimiento de la penicilina y otros antibióticos abrió un nuevo y amplio campo a la Microbiología industrial. Las bacterias y los hongos producen una gran cantidad de sustancias que, conjuntamente con las "sustancias vegetales secundarias" se designan como metabolitos secundarios. Muchas de estas sustancias tienen un papel importante como medicamentos, estimulantes, aditivos en la alimentación, etc. Los microorganismos han alcanzado una gran importancia económica como productores de metabolitos secundarios. El descubrimiento y la investigación de los antibióticos, así como el desarrollo de nuevos antibióticos semisintéticos, han adquirido un valor incalculable en la terapia médica. Aún no se ven los límites en el descubrimiento, modificación y aplicación de los metabolitos secundarios producidos por los microorganismos. La utilización consecuente de la obtención y selección de mutantes, basada en la consideración de los mecanismos de regulación, abre numerosas y amplias perspectivas en las posibilidades de aplicación.

10.5.1 Organismos y descubrimiento

Desde el siglo XIX se conocen ya las relaciones simbióticas y antagónicas entre los microorganismos. El punto de partida para el esclarecimiento del principio material de la antibiosis, lo dio la observación (A. FLEMING, 1928) de que la colonia de un hongo (*Penicillium notatum*) inhibía el crecimiento de los estafilococos. El compuesto excretado por este *Penicillium* y que difundía a través del agar, se denominó penicilina. Desde entonces se han aislado numerosas sustancias con acción antibiótica. Los **antibióticos** son sustancias de origen biológico, que inhiben el crecimiento de los microorganismos ya a concentraciones muy bajas. Se diferencia por lo menos entre sustancias de acción inhibidora (bacteriostática, fungistática) y de acción letal (bactericida, fungicida, etc).

Microorganismos productores de antibióticos. Los productores principales de antibióticos son hongos del grupo de los aspergilales, los actinomicetos y algunas otras bacterias. Desde el punto de vista de la diversidad química de los compuestos producidos, los estreptomicetos ocupan el primer lugar. Hasta ahora se han caracterizado profundamente un total de 2000 antibióticos; no obstante, únicamente 50 antibióticos se utilizan en la quimioterapia. El número de las actividades antibióticas descritas es aún mayor; además muchos grupos de microorganismos no han podido ser estudiados suficientemente ni se han podido comprobar sus actividades antagónicas, debido a que se trata de bacterias y hongos inferiores muy difíciles de cultivar.

Significación de los antibióticos para el microorganismo productor. Aún está sin aclarar cuál es el significado de los antibióticos para los organismos que los producen en su propio **hábitat en el suelo.** Los antibióticos se producen a través de vías biosintéticas específicas, que se incluyen dentro de las del metabolismo secundario. Las vías metabólicas y los enzimas que conducen a los metabolitos secundarios no son imprescindibles para el crecimiento y el mantenimiento celular. Por tanto, la síntesis de los antibióticos, así como el aparato genético necesario, representan un lastre para el organismo que debería haber sido eliminado por deleción en el proceso evolutivo. Partiendo de la base de que únicamente se mantiene aquello que tiene un sentido, hemos de ver en los antibióticos unas sustancias que ofrecen una ventaja al productor en su propio hábitat, en el suelo, actuando por ejemplo, contra los competidores que utilicen el mismo sustrato. Sin embargo, estas relaciones antagónicas casi no son demostrables en el suelo, ya que la producción es cuantitativamente muy baja y los antibióticos inhiben también al organismo productor.

Continuamente nos vamos haciendo a la idea de que durante la evolución también puede haberse ido arrastrando un material genético innecesario, incluso cuando signifique un lastre (bajo las condiciones experimentales utilizadas hasta el momento). La naturaleza es probablemente más conservadora de lo que se había considerado en los primeros tiempos de la era de la Biología Molecular. Por ello, se cuenta a los antibióticos y otros metabolitos secundarios cuya utilidad inmediata para las células productoras no ha podido ser demostrada, entre las "virutas metabólicas" o como productos aparecidos en "el terreno de juego del metabolismo". Con ello queda claro que el metabolismo secundario de las bacterias, los hongos y las plantas ofrece todavía un campo importante para el conocimiento de la evolución de los organismos.

Demostración de la producción de antibióticos. Los primeros antibióticos se descubrieron casualmente debido a la **formación de halos de inhibición.** Sobre placas de agar en las que se había sembrado una bac-

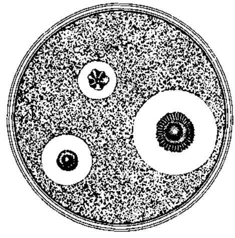


Fig. 10.4 Puede reconocerse la segregación de antibióticos por las bacterias y hongos por la aparición de halos de inhibición en las placas de agar sembradas de forma regular con bacterias indicadoras *(Staphylococcus aureus).*

teria indicadora de forma que tuviera un crecimiento confluente, quedaba alrededor de las colonias de hongos o de estreptomicetos un halo sin crecimiento; el antibiótico procedente de esta colonia y difundido a través del agar determinaba la formación de un halo de inhibición en el tapiz continuo de bacterias (Fig. 10.4). Como bacterias indicadoras se utilizaron microorganismos representativos. Para la determinación cualitativa de un productor de antibióticos es suficiente con sembrarlo en el centro de una placa de agar ordinario, sembrar la bacteria indicadora de forma radial con el asa en forma de estría (test de la estría; Fig. 10.5). Tras la incubación puede saberse el espectro de acción del antibiótico en base al grado de la inhibición del crecimiento sobre los distintos organismos indicadores. Los antibióticos se diferencian entre sí por su acción sobre las bacterias Gram positivas y Gram negativas, las levaduras, los dermatófitos y otros microorganismos de un modo característico.

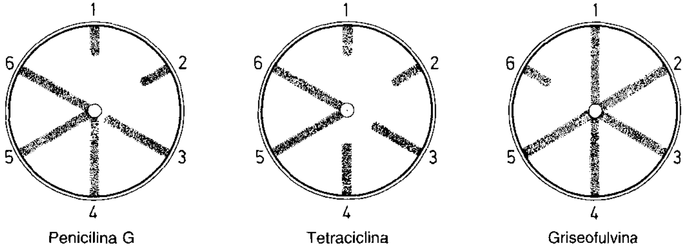


Fig. 10.5 Prueba por estría para determinar los espectros de acción de tres antibióticos. (1) *Staphylococcus aureus*; (2) *Streptococcus*; (3) *Escherichia coli*; (4) *Pseudomonas aeruginosa*; (5) *Candida albicans*; (6) *Tricophyton rubrum.* En el centro de una cápsula de Petri cubierta con agar que contenga peptona e hidrolizado de caseína se coloca un trozo de papel de filtro embebido en 10 µg del antibiótico que se desea determinar. Con ayuda de un asa de platino se han sembrado radialmente por estría los organismos indicadores desde el 1 hasta el 6. Algunos organismos no han crecido en el halo de difusión (de WALLHÄUSSER, K.H., H. SCHMIDT: Sterilisation, Desinfektion, Konservierung, Chemotherapie. Thieme, Stuttgart 1967).

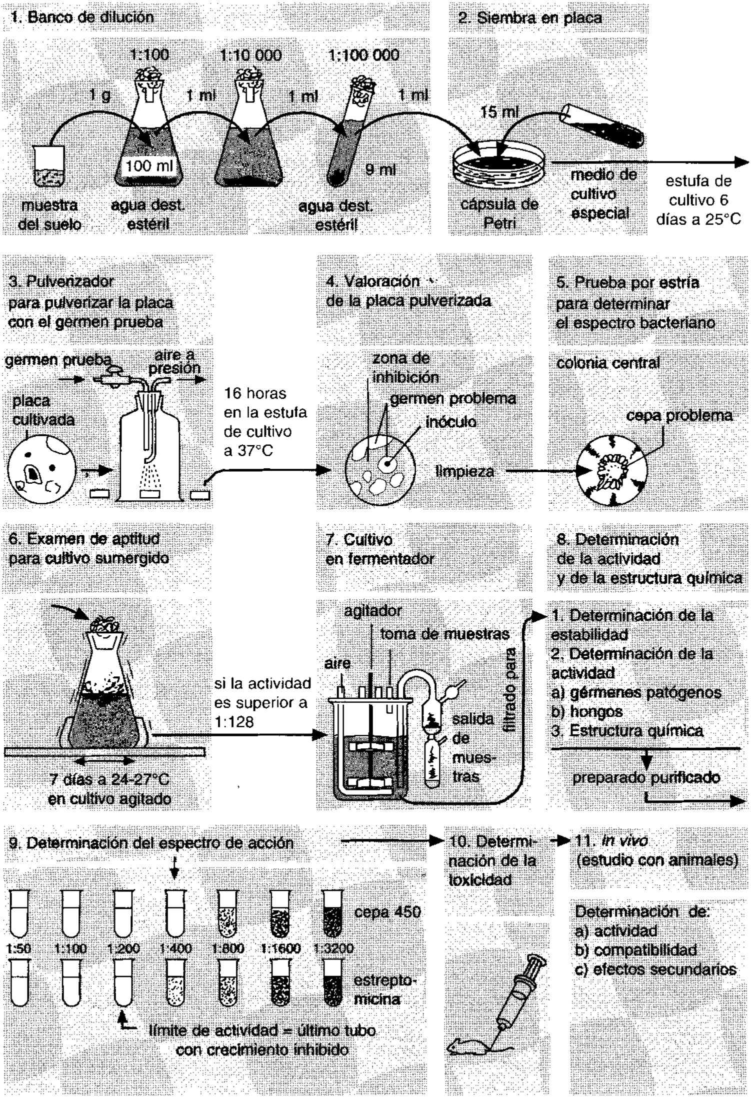

1. Banco de dilución
1:100
1:10 000
1:100 000
1 g
1 ml
1 ml
1 ml
100 ml
9 ml
muestra del suelo
agua dest. estéril
agua dest. estéril
2. Siembra en placa
15 ml
cápsula de Petri
medio de cultivo especial
estufa de cultivo 6 días a 25°C
3. Pulverizador para pulverizar la placa con el germen prueba
germen prueba
aire a presión
placa cultivada
16 horas en la estufa de cultivo a 37°C
4. Valoración de la placa pulverizada
zona de inhibición
germen problema
inóculo
limpieza
5. Prueba por estría para determinar el espectro bacteriano
colonia central
cepa problema
6. Examen de aptitud para cultivo sumergido
7 días a 24-27°C en cultivo agitado
si la actividad es superior a 1:128
7. Cultivo en fermentador
agitador
toma de muestras
aire
salida de muestras
filtrado para
8. Determinación de la actividad y de la estructura química
1. Determinación de la estabilidad
2. Determinación de la actividad
a) gérmenes patógenos
b) hongos
3. Estructura química
preparado purificado
9. Determinación del espectro de acción
cepa 450
1:50
1:100
1:200
1:400
1:800
1:1600
1:3200
estreptomicina
límite de actividad = último tubo con crecimiento inhibido
10. Determinación de la toxicidad
11. In vivo (estudio con animales)
Determinación de:
a) actividad
b) compatibilidad
c) efectos secundarios

Fig. 10.6 Pasos a seguir en un programa de determinación de antibióticos (de Wallhäusser, K.H., H. Schmidt. Sterilisation, Desinfektion, Konservierung, Chemotherapie. Thieme, Stuttgart 1967).

La mayoría de los antibióticos se descubrieron en el curso de un programa de prospección ("screening"). En la figura 10.6 se indican distintos pasos de un programa de este tipo, desde la suspensión de la muestra de suelo hasta la experimentación sobre animales; el esquema no requiere ninguna explicación.

Determinación cuantitativa. Para la determinación cuantitativa de la acción de un antibiótico se utiliza el test de difusión en placa (véase Fig. 10.7), el test de las diluciones y también otros métodos. Para la realización del **test de difusión en placa** se llenan éstas con un medio de cultivo inoculado con la bacteria indicadora y hasta un nivel determinado. Sobre estas placas se colocarán posteriormente las disoluciones que se quieran comprobar, del siguiente modo: a) en agujeros previamente preparados, o b) pipeteándolas en cilindros de vidrio o metálicos, o c) impregnando un papel de filtro cortado en discos que se coloca sobre la superficie del agar. En los casos positivos se ve después de la incubación un halo de inhibición, cuyo diámetro es proporcional al logaritmo de la concentración del antibiótico si las condiciones de experimentación son constantes (composición del medio de cultivo, grosor del medio, densidad del inóculo, tiempo de incubación y temperatura de incubación, etc.) (Fig. 10.7).

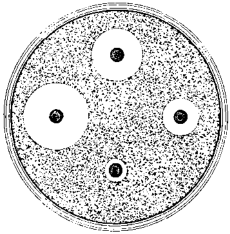


Fig. 10.7 Prueba de difusión en placa para determinar cuantitativamente un antibiótico. En los papeles de filtro colocados en la superficie sembrada del agar se habían vertido distintas cantidades del antibiótico. El diámetro del halo de inhibición nos da una medida de la concentración del antibiótico (según Zähner, H.: Biologie der Antibiotica. Springer, Berlín 1965).

En el **test de las diluciones seriadas** el antibiótico cuya acción se puede determinar se añade a un medio de cultivo inoculado con el organismo indicador de forma que se van haciendo diluciones a la mitad y una vez transcurrido el tiempo de incubación se determina aquella concentración mínima en la que ya no es posible el crecimiento (concentración bacteriostática mínima).

Se han desarrollado procedimientos especiales para determinar las acciones sinergísticas y antagónicas entre distintas sustancias, así como para la determinación de los efectos sobre otros organismos (protozoos, helmintos, algas, tejidos celulares, virus).

10.5.2 Antibióticos de importancia terapéutica

A continuación presentaremos algunos antibióticos de aplicación quimioterapéutica. El primer puesto lo ocupa aún el antibiótico producido por *Penicillium notatum*, *P. chrysogenum* y por otros hongos, la **penicilina**, sobre todo al haberse conseguido la producción de penicilinas semisintéticas (escisión del ácido 6-aminopenicilánico y sustitución por otras cadenas laterales). Ya hemos indicado anteriormente el punto de ataque de la penicilina sobre el metabolismo bacteriano (pág. 54). Para el hombre es prácticamente inocuo y sólo un bajo porcentaje de los individuos tratados con ella puede presentar reacciones alérgicas. Muchas bacterias producen *penicilinasa* e inactivan a la penicilina por rotura del anillo ß-lactámico. Por sustitución del ácido 6-aminopenicilánico por ácidos clorados pueden sintetizarse cientos de penicilinas (Fig. 10.8). Muchas penicilinas semisintéticas no se abren por acción de la *penicilinasa* y pueden administrarse también por vía oral gracias a su estabilidad frente a los ácidos.

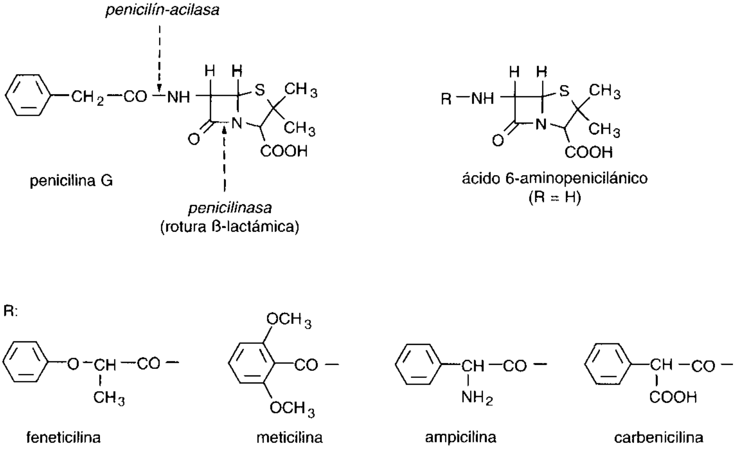
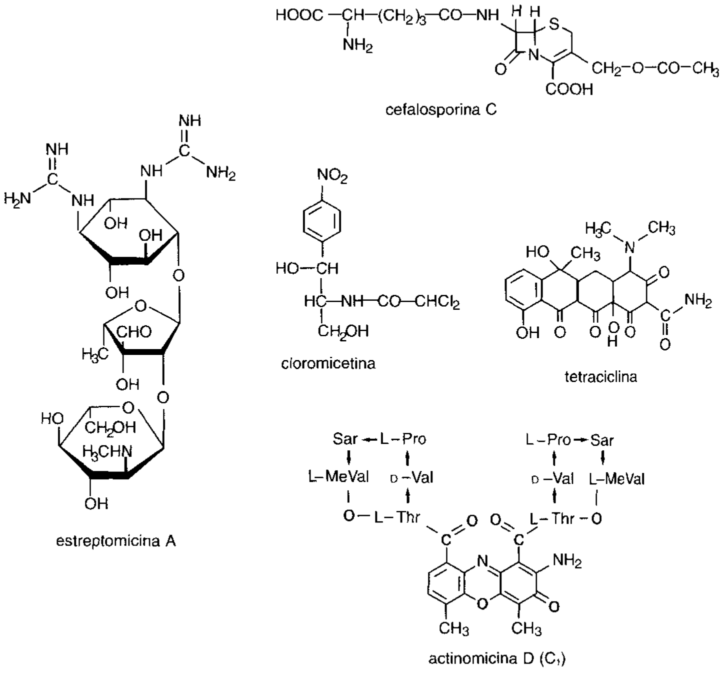

penicilín-acilasa
H H
CH$_2$—CO—NH
S
CH$_3$
N
CH$_3$
O
COOH
penicilina G
penicilinasa
(rotura ß-lactámica)
H H
R—NH
S
CH$_3$
N
CH$_3$
O
COOH
ácido 6-aminopenicilánico
(R = H)
R:
O—CH—CO—
CH$_3$
OCH$_3$
CO—
OCH$_3$
CH—CO—
NH$_2$
CH—CO—
COOH
feneticilina
meticilina
ampicilina
carbenicilina

Fig. 10.8 Puntos de ataque de los enzimas bacterianos *penicilinasa* y *penicilín-acilasa* sobre la penicilina G. Por transformación del ácido 6-aminopenicilánico (sustitución de R) con los cloruros ácidos de los restos ácidos indicados más abajo pueden obtenerse las penicilinas semisintéticas feneticilina, meticilina, ampicilina y carbenicilina.

Las **cefalosporinas** son excretadas por una especie del hongo *Cephalosporium*. La cefalosporina C posee un anillo ß-lactámico y es semejante a la penicilina (Fig. 10.9). Por rotura de la cadena lateral y sustitución del ácido 7-cefalosporínico mediante otras cadenas laterales pueden producirse cefalosporinas semisintéticas (cefalotina, cefaloridina), cuya acción es semejante a la de los derivados de la penicilina.

La **estreptomicina** se aisló a partir de un medio de cultivo de *Streptomyces griseus* y es producida también por otras especies de *Streptomyces*. Está compuesta por tres unidades: *N*-metil-L-2-glucosamina, una metilpentosa y un derivado del inositol con dos restos de guanidina (Fig. 10.9). La estreptomicina debe el éxito de su aplicación a la acción sobre una serie de bacterias ácido-resistentes y Gram negativas, que no son atacables por la penicilina. En el hombre se dan muchas reacciones alérgicas secundarias. La estreptomicina se utiliza también en veterinaria y en la lucha contra las enfermedades vegetales.

La **cloromicetina** (= **cloranfenicol**) se encontró en primer lugar en cultivos de *Streptomyces venezuelae*, pero también puede obtenerse por vía


HOOC—CH—(CH2)3—CO—NH
NH2
H H
S
N
O
COOH
CH2—O—CO—CH3
NH
C
NH
NH2
H2N
OH
O
CHO
H3C
HO
CH2OH
H3CHN
NO2
HO—CH
HC—NH—CO—CHCl2
CH2OH
H3C
CH3
N
HO
NH2
Sar ← L-Pro
L-MeVal
D-Val
O—L-Thr
L-Pro → Sar
D-Val
L-MeVal
L-Thr—O
C
CH3

cefalosporina C

estreptomicina A

cloromicetina

tetraciclina

actinomicina D (C_1)

Fig. 10.9 Fórmulas estructurales de cefalosporina C, estreptomicina A, cloromicetina (= cloranfenicol), tetraciclina y actinomicina D (= actinomicina C_1). L-Thr = L-treonina; D-Val = D-valina; L-Pro = L-prolina; Sar = sarcosina; L-MeVal = N-metil-L-valina.

sintética (Fig. 10.9). Es extraordinariamente estable y actúa contra muchas bacterias Gram negativas, pero también contra espiroquetas, rickettsias, actinomicetos y virus de gran tamaño.

Las **tetraciclinas** son excretadas por estreptomicetos (entre ellos *Streptomyces aureofaciens*). Químicamente están muy relacionadas y proceden del esqueleto del naftaceno (Fig. 10.9). Las más conocidas son la clorotetraciclina (aureomicina), la oxitetraciclina (terramicina) y la tetraciclina. Se caracterizan por tener un amplio espectro de acción y por su buena tolerancia.

Entre los **macrólidos** se cuentan antibióticos de distintos orígenes con una masa molecular relativamente alta, que se caracterizan por poseer un anillo lactónico macrocíclico (eritromicina, carbomicina A, picromicina y otros).

La **actinomicina** se aisló en 1940 como el primer antibiótico producido por estreptomicetos. Se trata de una mezcla de varias sustancias, que tienen en común un cromóforo de fenoxazona; éste está sustituido por varias cadenas polipeptídicas distintas (Fig. 10.9).

Como último grupo debemos citar los **antibióticos polipeptídicos** (gramicidina S, polimixina, bacitracina, ristocetina, entre otros). La polimixina B está constituida por un anillo de siete aminoácidos con una cadena lateral peptídica (Fig. 10.10). Los antibióticos polipeptídicos tienen una alta afinidad por la membrana citoplasmática; por ello son igualmente tóxicos para las bacterias como para los eucariotas y por tanto no se utilizan en clínica. Debido a su capacidad para transportar de forma selectiva iones a través de la membrana se han utilizado en investigación como **ionóforos** (apartado 7.7). La **valinomicina** facilita, por ejemplo, el transporte de iones potasio a través de la membrana. Está formada por un anillo de doce miembros con valina, 2-hidroxiisovalerato y lactato como componentes, de forma que el ion potasio cabe en el espacio interno de la molécula. Debido a su contenido en valina y valerato el complejo valinomicina-K es lipófilo en su cara externa y es transportado fácilmente a través de la capa lipídica de la membrana. La adición de valinomicina a una suspensión de células conduce por tanto al empobrecimiento de las células en iones potasio.

En la industria farmacéutica la producción masiva de antibióticos ya no se realiza en ningún caso con las cepas originales, sino siempre mediante mutantes superproductores. El hongo de FLEMING producía aproximadamente 3 µg de penicilina/ml, las cepas utilizadas actualmente producen por lo menos una cantidad 2000 veces superior. Este incremento en el rendimiento se debe a la mutación y selección de cepas más activas, a la mejora de los medios de cultivo y a la investigación de las condiciones óptimas de cultivo. Una vez se conocen las vías biosintéticas de muchos

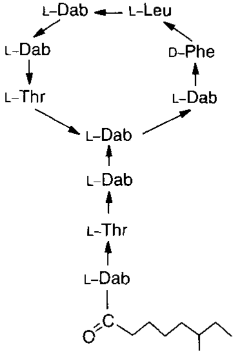


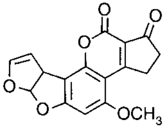
Fig. 10.10 Polimixina B. L-Dab = ácido 2,4-diaminobutírico; L-Leu = L-leucina; D-Phe = D-fenilalanina; L-Thr = L-treonina; la cadena lateral alifática es el ácido 6-metiloctánico.

antibióticos se está en disposición de incrementar sensiblemente los rendimientos por mutación y por una selección dirigida de mutantes.

10.5.3 Micotoxinas

Las micotoxinas son metabolitos secundarios de hongos con acción tóxica sobre el hombre y animales. Un productor de micotoxinas es por ejemplo, *Claviceps purpurea*, el cornezuelo del centeno (apartado 5.4). Los alcaloides que sintetiza, derivados del ácido lisérgico (ergotamina, ergotoxina) desempeñan un papel significativo en la terapia de enfermedades vasculares, migrañas, y como alucinógenos. Aunque la porción principal del cornezuelo del centeno (*Secale cornutum*) se produce aún actualmente por infección artificial del centeno con *C. purpurea*, el cultivo en profundidad de otras cepas, entre ellas *C. paspali*, parece ser económicamente interesante.

Muchos hongos, entre ellos los hongos de sombrerillo y los mixomicetos, son productores de venenos muy activos y son sustancias orgánicas parcialmente poco investigadas desde el punto de vista químico. Mostrarían probablemente acciones interesantes. Entre ellas se encuentran también las toxinas de las formas venenosas de los basidiomicetos *Amanita phalloides* (amanitatoxina), *A. pantherina*, *A. muscaria* e *Inocybe patouillardii* (atropina fúngica y muscarina). La investigación de la inmensidad de metabolitos secundarios de los hongos no ha hecho más que empezar. Las micotoxinas han vuelto a salir a la luz pública cuando miles de pavos jóvenes murieron a causa de alimentos contaminados con aflatoxinas. Las **aflatoxinas** son derivados de la cumarina y los forman algunas cepas de *Aspergillus flavus*, *A. parasiticus*, *A. oryzae* y otros hongos, y pueden encontrarse en todos los alimentos “enmohecidos” (frutos secos, cereales, frutos oleaginosos y piensos). Tienen propiedades cancerígenas.



aflatoxina B_1

10.6 Vitaminas

Actualmente las vitaminas se añaden de forma rutinaria a los alimentos y a los piensos, y por ello se producen en grandes cantidades. Aunque muchas vitaminas se obtengan por vía de la síntesis química, la producción de riboflavina, vitamina B_{12} y vitamina C está condicionada todavía a los microorganismos. La **riboflavina** es producida en cantidades de gramos por litro mediante ascomicetos (*Ashbya gossypii* y *Eremothecium ashbyii*) así como también por levaduras (*Candida*) y bacterias (*Clostridium*).

La **vitamina B_{12}** se sintetiza exclusivamente por microorganismos. Es esencial para los animales. Han de tomar las vitaminas con la alimentación o como un preparado vitamínico. La vitamina producida por las bacterias intestinales, entre ellas *E. coli*, no puede ser absorbida por los animales. Una adaptación para acceder a las vitaminas del interior intestinal se ve en los roedores, en los que la coprofagia está muy extendida. Para la producción industrial de vitamina B_{12} se emplean algunas bacterias, en cuyo metabolismo los corrinoides desempeñan un papel decisivo, como por ejemplo, las propionibacterias, clostridios, estreptomicetos y otras bacterias metanogénicas.

Los **carotenoides** se utilizan como aditivos alimentarios y dan a la yema del huevo una tonalidad amarilla (¡incluso en invierno!). Se aíslan a partir del micelio de zigomicetos (*Blakesleea trispora* y *Choanephora circinans*). No obstante, la síntesis química compite con la biotecnología microbiana.

La inclusión de un paso de bioconversión en la síntesis de la **vitamina C**, la oxidación del D-sorbitol a L-sorbosa, ya lo hemos mencionado (apartado 10.1). Actualmente se trabaja en la construcción de una cepa de *Erwinia* mediante ingeniería genética para la transformación directa de glucosa en ácido 2-ceto-L-gulónico, que por acidificación da directamente ácido ascórbico.

Los métodos habituales para el cultivo de bacterias, levaduras y otros hongos se están utilizando cada vez más para la producción de células animales y vegetales. Para el crecimiento de células vegetales sobre medios de cultivo sintéticos se están extendiendo métodos que permiten que estas células puedan crecer en fermentadores de varios miles de litros. En estas condiciones las células vegetales sintetizan enzimas y metabolitos secundarios en cantidades diez o cien veces superiores que en las plantas intactas. Sorprendentemente, también se acumulan sustancias que en la planta se sintetizan muy poco o incluso no son detectadas. Por ello, cabe esperar que en un futuro sea posible producir alcaloides, glucósidos, esteroides, ácidos orgánicos y otros metabolitos secundarios también con ayuda de células vegetales.

10.7 Exopolisacáridos

Para elevar la viscosidad de los líquidos se utilizan desde hace tiempo limos vegetales. En su lugar han ido apareciendo varios **exopolisacáridos** bacterianos (apartado 2.2.5) (Tab. 10.1). Como aditivo para helados, budines, cremas y para el recubrimiento hidrófilo de raíces para que mantengan la humedad se utilizan los alginatos. Los polisacáridos obtenidos a

Tab. 10.1 Exopolisacáridos de producción microbiana y su utilización.

Producto	Origen microbiano	Utilización
Dextrano (α-1,6-glucano)	*Leuconostoc mesenteroides, Klebsiella, Acetobacter,* estreptococos	sustituto de plasma sanguíneo, adsorbente en la indutria bioquímica
Alginato (ácidos manurónico y gulurónico unidos por enlace 1,4-glucosídico)	*Azotobacter vinelandii, Pseudomonas aeruginosa*	helados, flanes instantáneos, cremas; apresto de textiles y papel; recubrimientos hidrófilos de raíces vegetales, heridas y árboles
Xantana (celulosa sustituida con cadenas laterales trisacarídicas)	*Xanthomonas campestris*	aditivo de bebidas y queso fundido; cremas batidas, flanes instantáneos; estabilizante de emulsiones
Pululano (grupos de maltotriosa unidos por enlaces ß-1, 6-glucosídicos)	*Aureobasidium (*syn. *Pullularia = Dematium) pullulans*	cubiertas de alimentos
Curdlán (ß-1,3-glucano)	*Alcaligenes faecalis* var. *myxogenes*	gelificante de cremas; no se degrada en el intestino, por ello es pobre en calorías

partir de algas marinas van siendo sustituidos de forma creciente por productos obtenidos con la ayuda de *Azotobacter* y *Pseudomonas*. Una aplicación múltiple la tienen los limos formados por *Xanthomonas campestris*, la xantana, a partir de esta bacteria patógena de vegetales. Están formadas por cadenas de glucosa enlazadas por enlaces ß-1,4-glucosídicos (igual que la celulosa) y soportan cadenas laterales de trisacáridos. Las xantanas se utilizan como espesantes en la elaboración de productos alimenticios y en la industria cosmética, para emulsionar tintas de imprenta e incluso como aditivos en el agua de extracción de los yacimientos de petróleo. Para la preparación de budines y sopas pobres en calorías se utiliza el curdlán que no es degradado en el intestino humano. Acerca de la utilización del dextrano como sustituto de plasma sanguíneo y como base del sephadex (adsorbente) ya hemos insistido en el apartado 2.2.5.

10.8 Enzimas

La *renina* utilizada habitualmente en la producción del queso duro se ha extraído del estómago de los rumiantes y las *proteasas* necesarias para el tratamiento de las pieles a partir de excrementos pulverizados. Los procesos microbianos facilitan el acceso a estos enzimas, y han ampliado la oferta de enzimas utilizables en biotecnología (Tab. 10.2). El cuajo utilizado habitualmente en la producción de la cuajada de la leche se ha sustituido por la *renina* producida por *Mucor rouxii* y otros hongos. En el curso de la producción de alcohol hay que obtener azúcares a partir del almidón; ahora ya no hay que partir del grano germinado de cereales, sino que se añade *amilasa* fúngica al almidón. Para obtener fructosa a partir de almidón, que tiene mayor poder edulcorante que la sacarosa o la glucosa, se transforma el almidón por la *α-amilasa* y la *glucoamilasa* a glucosa, y ésta en un elevado porcentaje a fructosa mediante la *glucosa-isomerasa*. Para la degradación del almidón también resulta apropiada la *pululanasa* que hidroliza uniones α-1,4-glucosídicas y α-1,6-glucosídicas. Diversos preparados relativamente termotolerantes de estos enzimas se obtienen de bacilos, estreptomicetos y bacterias lácticas. Las *proteasas* y las *lipasas* se utilizan como aditivos en detergentes. También se intenta obtener celulosa barata a partir de madera y obtener azúcar a partir de paja mediante *celulasas* de origen microbiano (de *Trichoderma viride* o *Penicillium*) para sustrato de la producción de etanol. Los enzimas indicados hasta ahora son **exoenzimas**; son liberados por los microorganismos y se recuperan del medio de cultivo. Entre los enzimas aislados a partir de sistemas celulares, preferentemente bacterias, y que ofrece la industria bioquímica, se encuentran las *endonucleasas* y otros enzimas de aplicación en ingeniería genética. La tecnología genética ha abierto las puertas a nuevas posibilidades de utilización de los enzimas microbianos en la Biotecnología.

Tab. 10.2 Enzimas de producción microbiana y su utilización.

Nombre del enzima y reacción catalizada	Origen microbiano	Utilización
Renina coagulación de la caseína de la leche	*Mucor rouxii*	obtención de queso duro
Invertasa hidrólisis de sacarosa	*Aspergillus oryzae* levaduras y otros hongos	obtención de azúcar para golosinas
Proteasas hidrólisis de proteína	*Bacillus subtilis* y otras bacterias, también hongos	aditivos de productos de lavado; curtidos
Pectinasa y enzimas pectinolíticos hidrólisis de pectina	hongos y *Erwinia*	clarificación de zumos de frutas
Lipasa hidrólisis de lípidos	hongos y *Pseudomonas*	curtidos, aditivos de productos de lavado
Glucosa-oxidasa oxidación a gluconato	*Aspergillus niger* *Gluconobacter oxydans*	obtención de ácido glucónico
Hexosa-isomerasa isomerización de fructosa	*Streptomyces*	obtención de fructosa a partir de glucosa
Amilasa hidrólisis de almidón	*Bacillus subtilis*, *Aspergillus* spec., otros hongos	obtención de jarabe de glucosa; eliminación del apresto de almidón
Celulasas hidrólisis de celulosa	*Trichoderma viride* *Penicillium*	glucosa de celulosa

Junto a los productos procedentes de las transformaciones microbianas se producen desde hace pocos años las primeras proteínas no microbianas. La técnica de clonación molecular (apartado 15.5) permite introducir DNA exógeno en plásmidos y transferirlo a bacterias (o levaduras). Si se da una buena expresión de estos genes externos se forman en la bacteria (o levaduras) las proteínas correspondientes. La producción industrial de interferón, insulina, somatostatina, *uroquinasa*, proteínas víricas y otros terapéuticos y vacunas está ya en marcha.

La investigación de enzimas de aplicación industrial incluye actualmente también su capacidad de **inmovilización**, esto es, su unión a celulosa, agarosa, alginatos o bolas de vidrio, así como su inclusión en cápsulas. Así se pueden estabilizar claramente algunos enzimas.

10.9 Biomasa

Los microorganismos se producen también en grandes cantidades para utilizarlos como alimento o pienso (levaduras y bacterias, hongos comestibles), material para inocular plantas (rizobios), en panadería (levadura) como cultivo iniciador o starter para la preparación de leches ácidas y embutidos crudos, así como para otros muchos fines. La obtención de levadura para piensos (*Candida*) en base a las lejías sulfíticas de la industria papelera se remonta ya a más de 30 años. Después de que en las épocas de crisis se produjesen proteínas de levaduras para el consumo humano, se desarrollaron en los años 70 varios procesos para la producción masiva de **proteína de unicelulares** (single cell protein, SCP). Como sustrato y como organismos se probaron petróleo e hidrocarburos puros (*Candida lipolytica*), hidrógeno + anhídrido carbónico (*Alcaligenes eutrophus*), metanol (*Methylomonas*), etanol y compuestos orgánicos de alto valor que aparecen como desechos en la síntesis química. La "revolución verde" y la optimización de los métodos agrícolas ha hecho innecesario el desarrollo posterior de los procesos más relevantes.

El interés por la biomasa se ha renovado cuando se supo que algunos materiales de reserva de las bacterias, **ácido poli-ß-hidroxi-butírico (PHB)** es maleable y termoplástico (como el polipropileno o el polietileno) y puede dar películas, fibras y recipientes como botellas y vasos, y es **biodegradable**. El PHB se almacena intracelularmente en grandes cantidades por algunas bacterias en condiciones adecuadas con azúcares como sustrato. *Alcaligenes eutrophus* alcanza sin dificultad un contenido en PHB de más del 90% (peso/peso) del peso seco. Se han establecido las condiciones bajo las cuales, junto al PHB, se forman también poli-ß-hidroxivaleriánico y poli-γ-hidroxivaleriánico, así como poli-ß-hidroxioctanoato y otros polihidroxialcanoatos (PHA) por otras bacterias. Ello permite augurar con toda seguridad un gran futuro a la producción industrial de homo y heteropolímeros compatibles con el medio ambiente.

Una visión ampliada puede conseguirse con el estudio de textos especializados en Biotecnología, de revistas especializadas en temas aplicados y en los análisis de mercados y productos.

11. Dadores inorgánicos de hidrógenos: bacterias aeróbicas quimiolitotrofas

Varios grupos de bacterias de los suelos y de las aguas son capaces de utilizar **compuestos o iones inorgánicos** (amonio, iones nitrito, sulfuro, tiosulfato, sulfito y hierro (II)) así como azufre elemental o hidrógeno como dadores de hidrógeno o bien de electrones; en su oxidación pueden obtener equivalentes de reducción y energía para los procesos sintéticos. La obtención de energía tiene lugar, por lo general, a través de la respiración con el oxígeno como aceptor terminal de hidrógenos. Sólo unos pocos especialistas pertenecientes a este grupo son capaces de crecer utilizando el nitrato, el nitrito o el óxido nitroso como aceptor de hidrógenos en el curso de una "respiración anaeróbica". Este tipo de vida con un dador inorgánico de hidrógenos se conoce como **quimiolitotrofia**, denominado anteriormente también como "inorgoxidación".

Bacterias aeróbicas quimiolitotróficas

dador inorgánico de electrones y producto de oxidación	denominación del grupo	especies representativas
$\boxed{NH_3} \xrightarrow{O_2} \boxed{NO_2^-}$	oxidadores del amonio	*Nitrosomonas europaea*
$\boxed{NO_2^-} \xrightarrow{O_2} \boxed{NO_3^-}$	oxidadores del nitrito	*Nitrobacter winogradskyi*
$\boxed{S^0, S^{2-}, S_2O_3^{2-}} \xrightarrow{O_2} \boxed{SO_4^{2-}}$	oxidadores del azufre	*Thiobacillus thiooxidans*
$\boxed{Fe^{2+}} \xrightarrow{O_2} \boxed{Fe^{3+}}$	bacterias del hierro	*Thiobacillus ferrooxidans*
$\boxed{H_2} \xrightarrow{O_2} \boxed{H_2O}$	bacterias del gas detonante (o del hidrógeno)	*Alcaligenes eutrophus*
$\boxed{CO} \xrightarrow{O_2} \boxed{CO_2}$	carboxidobacterias	*Pseudomonas carboxidovorans*

La mayoría de las bacterias que pertenecen a este grupo metabólico crecen con **anhídrido carbónico** como única fuente de carbono o como fuente principal del carbono celular. Son por tanto **autótrofos** (quimiolitoautótrofos). Todas las bacterias quimiolitoautótrofas aeróbicas comprobadas hasta el momento asimilan el carbono del CO_2 a través de la fijación del CO_2 por el ciclo de la ribulosabifosfato; por ello veremos a modo de apéndice en este capítulo el mecanismo de este tipo de fijación del CO_2.

Algunas bacterias quimiolitotrofas están ligadas de forma estricta a este tipo de vida; otras pueden crecer también alternativamente como quimioorganoheterótrofas, y son por tanto quimiolitotrofas facultativas.

Muchas de estas bacterias quimiolitoautótrofas son especialistas y tienen una situación monopólica. La oxidación del amonio, el nitrito y los compuestos inorgánicos del azufre van ligados en la naturaleza en primer lugar a la actividad de las bacterias nitrificantes y de las oxidadoras del azufre.

11.1 Oxidación del amonio y del nitrito: nitrificación

En el curso de la descomposición aeróbica o anaeróbica de la materia orgánica que contiene nitrógeno se libera éste en forma de amonio. Se conoce desde antiguo que en el compost formado con estiércol se produce **salitre**; la sal que se forma en los muros de piedra de los depósitos subterráneos de estiércol se utiliza desde la Edad Media para producir pólvora ("sal petrae"). Según las indicaciones antiguas se disponía la tierra, la caliza y los compuestos orgánicos que contuviesen nitrógeno en forma de bancales en las grutas en las que se almacenaba el estiércol; estos bancales se almacenaban y se regaban con orina y sangre manteniéndolos bien aireados. El amonio liberado en el proceso de descomposición microbiana de los materiales orgánicos difundía en la cubierta de tierra y se oxidaba en presencia del oxígeno atmosférico a nitrato. La cubierta de tierra era utilizada por los productores de salitre como material de partida; se lixiviaba con agua y la disolución se utilizaba para obtener el salitre por concentración.

La transformación de amonio a nitrato, la nitrificación, se da tanto en los suelos como en las aguas a través de la acción de las bacterias nitrificantes. No se conoce ninguna bacteria que sea capaz de transformar directamente el amonio a nitrato; en esta oxidación participan más bien dos grupos de bacterias. Los oxidadores del amonio forman nitrito y los oxidadores del nitrito, nitrato.

Las especies más conocidas son *Nitrosomonas europaea* y *Nitrobacter winogradskyi* (Tab. 11.1). Según investigaciones recientes las especies de *Nitrosolobus*, y no las de *Nitrosomonas*, son los nitrificantes predominan-

Tab. 11.1 Bacterias nitrificantes.

Oxidantes del amonio (nitroso)	Oxidantes del nitrito (nitro)
$NH_4^+ + 1\frac{1}{2} O_2 \rightarrow NO_2^- + 2\,H^+ + H_2O$	$NO_2^- + \frac{1}{2}\,O_2 \rightarrow NO_3^-$
Nirosomonas europaea	*Nitrobacter winogradskyi*
Nitrosococcus oceanus	*Nitrobacter agilis*
Nitrosospira briensis	*Nitrobacter hamburgensis*
Nitrosolobus multiformis	*Nitrococcus mobilis*

tes en los suelos explotados en agricultura. Ambos géneros están extremadamente especializados en las capacidades de oxidación anteriormente indicadas. El oxidador del amonio ofrece al oxidador del nitrito su sustrato. Ya que las concentraciones elevadas de amonio en los suelos alcalinos actúan de forma tóxica sobre *Nitrobacter*, *Nitrosomonas* logra al mismo tiempo las condiciones vitales para *Nitrobacter*, puesto que consume el amonio y forma un ácido (transforma un catión en un anión).

Las **nitrificantes** son bacterias Gram negativas, que se reúnen en la familia de las Nitrobacteriáceas. *Nitrosomonas europaea* es una bacteria oval de flagelación polar. En los hábitats marinos parece ser *Nitrosococcus oceanus* (Fig. 2.22) el responsable de la oxidación del amonio. Las bacterias nitrificantes pueden cultivarse en medios exclusivamente minerales, aunque crecen lentamente con tiempos de generación que oscilan entre las 10 y las 20 horas. Los nitrificantes han sido considerados hasta ahora como quimiolitoautótrofos obligados e incapaces de utilizar los sustratos orgánicos que se añadían a los medios de cultivo. Esta abstinencia tan absoluta está siendo puesta en duda cada vez más y se investiga intensamente. Por ejemplo, *N. winogradskyi* es capaz de incorporar a su material celular (proteína, poli-ß-hidroxibutirato) al acetato que se añada al medio de cultivo.

Reacciones en la oxidación del amonio. Probablemente el amonio se oxida a través de los siguientes intermediarios:

$$NH_3 \longrightarrow NH_2OH \longrightarrow [NOH] \longrightarrow NO_2^- \longrightarrow NO_3^-$$

El primer paso es endergónico y está catalizado por una *amonio-monooxigenasa*; el átomo de oxígeno del NH_2OH procede del oxígeno molecular. El segundo paso está catalizado por una *hidroxilamino-óxido-reductasa*. En la oxidación del nitrito los electrones se transfieren al citocromo a_1. Únicamente los pasos de oxidación de la hidroxilamina a nitrito y del nitrito al nitrato pueden ser energéticamente utilizables.

Papel de los nitrificantes en el suelo. Los iones de amonio liberados en la mineralización de las sustancias que contienen nitrógeno son oxidados rápidamente en los suelos bien aireados; la transformación de un catión en un anión determina una acidificación del suelo y por tanto un incremento en la solubilidad de los minerales (potasio, magnesio, calcio y fosfato). Por ello se veía en la microflora nitrificante un factor esencial para la productividad de los suelos. Este punto de vista ha variado. Los iones amonio son retenidos por los suelos mejor que el nitrato, sobre todo por adsorción a minerales arcillosos y por su unión más o menos intensa con los componentes del humus; el nitrato se lava fácilmente. Por ello se intenta impedir la nitrificación sobre las superficies de cultivo y se buscan agentes que inhiban específicamente el crecimiento de los nitrificantes para que puedan utilizarse en la práctica como unos mantenedores del nitrógeno ("N-serve" = nitrapirina = 2-cloro-6-(triclorometil)-piridina).

De todos modos el crecimiento y el metabolismo de las bacterias nitrificantes autótrofas únicamente es óptimo en un margen de pH que va de 7 a 3. Por ello, el margen de pH para una nitrificación total del amonio hasta el nitrato es muy estrecha, porque el amonio libre (en la zona alcalina) y el ácido nítrico (en el margen ácido) actúan como tóxicos sobre *Nitrobacter*. Como se sabe las concentraciones en NH_3 libre y HNO_2 también libre son dependientes del pH.

Las bacterias nitrificantes están implicadas también indirectamente en la descomposición de piedras calcáreas y de cementos (construcciones, autopistas) ya que oxidan el amonio procedente de la atmósfera o de los excrementos de animales.

El grupo de los oxidadores del amonio tiene una gran importancia ecológica, que va más allá de su función conocida. Los suelos abonados con sales de amonio liberan óxidos de nitrógeno (NO, N_2O) sobre todo en deficiencias de oxígeno (terrenos con humedad permanente). Se ha comprobado en *Nitrosomonas* y *Nitrosovibrio* que estas bacterias son capaces de desarrollar una respiración de nitratos (desnitrificación). NO y N_2O son productos consecuencia de la reducción del nitrito formado en la oxidación del NH_3.

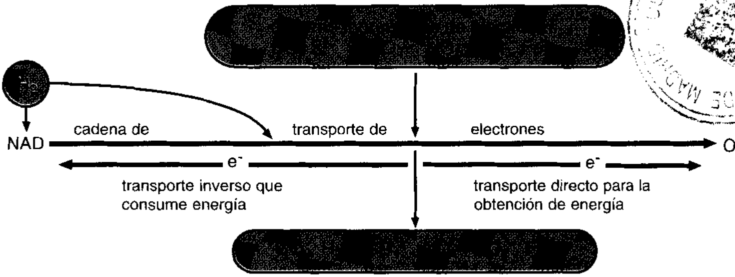
En los oxidadores del amonio se han demostrado otras características más: oxidan el metano, metanol, monóxido de carbono, etileno, propileno, ciclohexano, benceno y fenol. Disponen por tanto de un gran potencial de oxidación. Forman parte de la flora autóctona del suelo, y probablemente están implicados en la lenta oxidación de los productos intermediarios que se liberan durante la degradación de las sustancias orgánicas.

También se estudió si las bacterias metilotróficas oxidadoras del metano (apartado 14.11.1), que oxidan su sustrato, el metano, mediante una reacción inicial de oxidación por una **mono-oxigenasa**, también son capaces de oxidar el amonio además del metano. Éste es el caso; no obstante, las bacterias metilotróficas no pueden crecer con amonio como sustrato. El proceso hay que incluirlo dentro de la nitrificación heterotrófica.

Nitrificación heterotrófica. El que en realidad los nitrificantes autótrofos representen una situación monopólica en la naturaleza, o que también colaboren bacterias y hongos heterótrofos en la transformación del amonio al nitrato, es una cuestión que todavía debe aclararse. En cultivo puro existen únicamente cepas de *Arthrobacter* capaces de formar nitrito a partir de sustancias nitrogenadas. Algunos hongos son capaces de oxidar el nitrógeno amínico o el amonio hasta nitrato. En contraposición a lo que sucede con la nitrificación autotrófica, el proceso heterotrófico no va ligado a un crecimiento celular ni a una producción de biomasa; se trata probablemente de un tipo de cooxidación, esto es, una oxidación conjunta de amonio y un sustrato orgánico. Además, la tasa de nitrificación por organismos heterotróficos es de 10^3 a 10^4 veces menor que la autótrofa. Los nitrificantes heterótrofos no representan unos competidores serios de la situación monopólica de los autótrofos. Esta modesta nitrificación por organismos heterótrofos ofrece no obstante una explicación de la observación de que en los suelos ácidos (plantaciones de té, bosques de aciculifolios) tenga lugar una nitrificación donde los nitrificantes autótrofos no tendrían ninguna oportunidad.

Transporte inverso de electrones y rendimiento celular. Desde el punto de vista energético las bacterias autótrofas oxidadoras del amonio, del nitrito, de los compuestos de azufre o del hierro se encuentran en una situación extremadamente desfavorable. Sus sustratos tienen un potencial redox muy fuertemente positivo. Los potenciales normales E_0' suponen para el NH_4^+/NH_2OH, + 899 mV, para el NO_3^-/NO_2^-, + 420 mV, para el NO_2^-/NH_2OH, + 66 mV, para el Fe^{3+}/Fe^{2+}, + 770 mV, que contrastan con los – 320 mV del NAD/ $NADH_2$. La oxidación de estos sustratos no puede acoplarse directamente a la reducción del NAD. Sin embargo, se requiere NAD reducido para la reducción del CO_2 en el ciclo de la ribulosabifosfato. Se dispone de resultados experimentales que indican que los electrones que aparecen en la oxidación del sustrato penetran en la cadena respiratoria a nivel del citocromo c o del citocromo a; la ganancia energética es por tanto baja, ya que únicamente puede entrar en consideración un punto de fosforilación. Además, una parte de esta energía debe utilizarse para transferir parte de los electrones que llevan a nivel del citocromo a través de la cadena respiratoria hasta el nivel de los nucleótidos de piridina para poderlos reducir. Por tanto, para estas bacterias el transporte inverso de electrones es un mecanismo esencial para obtener equivalentes de reducción, imprescindibles para los procesos sintéticos (véase pág. 272).

BIBLIOTECA


NAD
cadena de
transporte de
electrones
O₂
e⁻
e⁻
transporte inverso que consume energía
transporte directo para la obtención de energía

Tab. 11.2 Comparación del rendimiento de células con respecto a la cantidad de fuente primaria de energía a transformar en distintas bacterias autótrofas y microorganismos organotrofos.

Para la síntesis de 1 g de células (masa seca) se transforman			
Thiobacillus ferrooxidans	156 g Fe^{2+}	*Alcaligenes eutrophus*	0,5 g H_2
Thiobacillus neapolitanus	30 g $S_2O_3^{2-}$	*Escherichia coli*	2 g glucosa
Nitrosomonas	30 g NH_3	Levadura	1 g petróleo

Los escasos **rendimientos celulares** están en concordancia con el escaso rendimiento energético que puede extraerse de la oxidación de los sustratos inorgánicos anteriormente citados. Para la síntesis de 1 g de células (masa seca) hay que transformar unas cantidades de sustratos mayores que las que necesitan otros organismos (Tab. 11.2). Además, muchas de las bacterias anteriormente citadas catalizan una "oxidación en punto muerto", esto es, oxidan a los sustratos sin sintetizar simultáneamente sustancia celular. No debe extrañar, por tanto, que las transformaciones en los suelos y en las aguas estén realizadas por un número de bacterias relativamente pequeño.

11.2 Oxidación de compuestos reducidos de azufre

Existe un grupo de bacterias Gram negativas, de flagelación polar, capaces de obtener energía en la oxidación de compuestos reducidos de azufre y que se incluyen en el género *Thiobacillus*. Recientemente se ha descubierto un *Spirillum* (*Thiomicrospira*) de flagelación bipolar y una bacteria termófila inmóvil (*Sulfolobus*) (Tab. 11.3). La mayoría de los tiobacilos pueden oxidar distintos compuestos de azufre formando sulfato como producto final:

$$S^{2-} + 2\,O_2 \longrightarrow SO_4^{2-}$$
$$S + H_2O + 1\tfrac{1}{2}\,O_2 \longrightarrow SO_4^{2-} + 2\,H^+$$
$$S_2O_3^{2-} + H_2O + 2\,O_2 \longrightarrow 2\,SO_4^{2-} + 2\,H^+$$

La mayoría de los tiobacilos (*T. thiooxidans*, *T. thioparus*, *T. denitrificans*) son quimiolitoautótrofos obligados que han de fijar CO_2. Otros crecen con compuestos orgánicos como fuentes de energía y carbono (*T. novellus*, *T. intermedius*).

Thiobacillus thiooxidans produce grandes cantidades de ácido sulfúrico y está adaptado a pH muy bajos; tolera el ácido sulfúrico 1 normal. Esta acidificación puede utilizarse de distintos modos. Por ejemplo, para descalcificar se añade azufre elemental a los suelos calcáreos; el ácido sul-

Tab. 11.3 Bacterias oxidadoras del azufre.

Especies	crecimiento a pH	dador de electrones	*
Thiobacillus thiooxidans	2-5	S^{2-}, $S_2O_3^{2-}$, S	o
Thiobacillus ferrooxidans	2-6	Fe^{2+}, $S_2O_3^{2-}$, S	f
Thiobacillus thioparus	6-8	CNS^-, $S_2O_3^{2-}$, S	o
Thiobacillus denitrificans	6-8	CNS^-, $S_2O_3^{2-}$, S	o
Thiobacillus intermedius	2-6	$S_2O_3^{2-}$, S, glutamato	f
Thiobacillus novellus	6-8	$S_2O_3^{2-}$, S, glutamato	f
Thiomicrospira pelophia	6-8	S^{2-}, $S_2O_3^{2-}$, S	o
Sulfolobus acidocaldarius	2-3	S, glutamato, peptona	f

* Autótrofo obligado (o) o facultativo (f).

fúrico formado por los tiobacilos transforma al carbonato cálcico en sulfato cálcico que es fácilmente soluble, por lo que está sometido al lavado. De modo semejante puede combatirse al causante de la sarna de la patata que es acidófobo.

Mientras que los tiobacilos anteriormente citados viven aeróbicamente, *T. denitrificans* puede utilizar también el nitrato como aceptor de hidrógenos (respiración anaeróbica). Es capaz de desnitrificar el nitrato, pero no de reducirlo a amonio para su propia asimilación; por ello necesita sales de amonio como fuente de nitrógeno.

Sulfolobus acidocaldarius y *Caldariella acidophila* son habitantes de ecosistemas extremos. Sus hábitats son las fuentes termales ácidas, donde oxidan predominantemente el sulfuro de hidrógeno magmático (vulcánico). *S. acidocaldarius* es una bacteria termófila quimiolitotrofa facultativa, capaz de oxidar el azufre elemental a ácido sulfúrico y de crecer óptimamente a pH entre 2 y 3 y a una temperatura de 70 a 75°C, pudiendo incluso tolerar temperaturas de 90°C.

Reacciones en la oxidación de los compuestos de azufre. Las reacciones que están implicadas en la oxidación del azufre fueron difíciles de comprender, porque el sulfuro de hidrógeno y el azufre en disoluciones acuosas pueden oxidarse de forma no biológica, aunque muy lentamente. El esquema (Fig. 11.1) representa las reacciones más importantes. El azufre elemental (flor de azufre) se presenta como un anillo de 8 átomos S_8; es medianamente soluble en agua (0,176 mg de azufre/litro).

Se cree que los electrones liberados en la oxidación del sulfito al sulfato entran en la cadena respiratoria a nivel del citocromo c. Por lo menos algunos tiobacilos (*T. thioparus*, *T. denitrificans*) son capaces de aprovechar en una fosforilación a nivel de sustrato la energía liberada en la oxidación del sulfito al sulfato (Fig. 11.1, (5) y (6)).

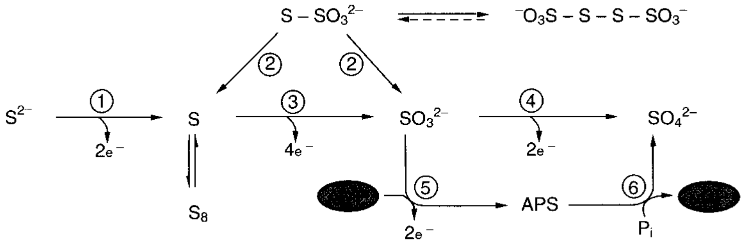


Fig. 11.1 Principales reacciones en la oxidación de compuestos de azufre por bacterias oxidadoras del azufre. Enzimas implicados: (1) *sulfuro-oxidasa*; (2) enzima clástico del tiosulfato (*rodanasa*); (3) enzima oxidante del azufre (*azufre-oxidasa*); (4) *sulfito-oxidasa*; (5) *APS-reductasa*; (6) *ADP-sulfurilasa* (*sulfato-adenililtransferasa*).

$$(1)\ SO_3^{2-} + AMP \xrightarrow{\textit{APS-reductasa}} APS + 2\ e^-$$

$$(2)\ APS + P_i \xrightarrow{\textit{ADP-sulfurilasa}} ADP + SO_4^{2-}$$

$$(3)\ 2\ ADP \xrightarrow{\textit{adenilato-quinasa}} AMP + ATP$$

Las reacciones (1) y (2) son contrarias a las transformaciones implicadas en la reducción disimilatoria del sulfato (Fig. 9.3).

Bacterias del azufre filamentosas y otras. En aquellos sedimentos de charcas, lagunas y aguas de curso lento donde se forme sulfuro de hidrógeno, se encuentran frecuentemente sobre la cubierta limosa oscura a algunas bacterias del azufre incoloras, *Beggiatoa*, *Thiothrix* y *Thioploca* (Fig. 2.46) así como las formas unicelulares grandes *Achromatium oxaliferum* y *Thiovulum* (Fig. 2.46). S.N. WINOGRADSKY realizó sus investigaciones sobre la quimioautotrofia con *Beggiatoa*. No obstante, hasta ahora no se han podido obtener cultivos puros de ninguna de estas "bacterias clásicas del azufre" y estudiar sus características fisiológicas y bioquímicas. La obtención de cultivos puros en el laboratorio y la investigación de las características fisiológicas y bioquímicas es muy difícil, ya que estas bacterias necesitan sulfuro de hidrógeno y oxígeno, pero a este último lo toleran únicamente en concentraciones muy bajas. Recientemente se ha podido demostrar en *Beggiatoa alba* la presencia de *ribulosabifosfato-carboxilasa* y establecer así la vía de la fijación autotrófica del CO_2.

El sulfuro de hidrógeno como base de un ecosistema afótico. La vida de todos los organismos heterotróficos superiores se basa en la biomasa producida por la fotosíntesis. Una excepción a esta regla se ha descubierto hace pocos años. En los mares profundos afóticos, donde no llega la luz y se separan los continentes, surge del fondo del mar agua caliente a

350ºC. El agua de estas fuentes termales contiene muchos minerales disueltos, entre ellos H_2S. Allí donde esta agua entra en contacto con el agua fría del mar pueden crecer bacterias oxidadoras del azufre o del H_2S. Son el alimento de moluscos, cangrejos y helmintos. Un tubícola, *Riftia pachyptila* (del grupo de los pogonóforos) está muy adaptado a este ecosistema; carece de boca y ano, pero dispone de un órgano, el trofosoma, en el que crecen como simbiontes bacterias oxidadoras del H_2S; la sangre suministra ácido sulfhídrico y oxígeno al órgano. Por tanto, en las proximidades de las fuentes termales de los fondos marinos existen ecosistemas basados en la producción de biomasa por quimiolitoautotrofia, y no por fotosíntesis.

11.3 Oxidación del hierro (II)

La bacteria del hierro *Thiobacillus ferrooxidans* oxida el hierro ferroso (II) a férrico (III):

$$4\ Fe^{2+} + 4\ H^+ + O_2 \longrightarrow 4\ Fe^{3+} + 2\ H_2O$$

Esta bacteria es muy semejante a *Thiobacillus thiooxidans*, tolera valores de pH hasta de 2,5, pero no sólo puede obtener energía por la oxidación de compuestos reducidos de azufre, sino que también en la oxidación de los iones Fe^{2+}. El hábitat normal de las bacterias del hierro son las aguas ácidas de los yacimientos de minerales que contienen sulfuros de metales como la pirita de hierro (FeS_2). La capacidad de desarrollarse quimioautotróficamente ha sido demostrada sin ninguna duda en las bacterias del hierro acidófilas.

Recientemente se han descubierto también cepas termófilas de tiobacilos oxidadores del hierro y del azufre, y cepas de la bacteria termófila *Sulfolobus acidocaldarius* que pueden oxidar el hierro ferroso. A partir de suelos que contenían antimonita se ha podido aislar una bacteria autótrofa oxidadora del antimonio, *Stibiobacter senarmontii,* capaz de oxidar Sb^{3+} a Sb^{5+}.

Lixiviación de minerales. La capacidad de algunas bacterias acidófilas oxidadoras del hierro y el azufre para transformar minerales sulfurosos y azufre elemental en los sulfatos metálicos solubles en agua hace que puedan utilizarse para la lixiviación de minerales de baja riqueza para obtener cobre, zinc, níquel, molibdeno y uranio. La lixiviación ("leaching processes") se realiza ya en grandes cantidades para la obtención de minerales a cielo abierto, probablemente podrá utilizarse también en las minas. La forma más sencilla consiste en dejar que el agua se vaya filtrando a través de gruesas capas del material rocoso que contiene el mineral desmenuzado, por ejemplo con la pirita (FeS_2), con los sulfuros metálicos asociados a ella, como el SCu_2 (chalcocita), SCu, SZn, SNi, S_2Mo, S_3Sb_2, SCo y SPb; finalmente se recoge la disolución que contiene las sales sulfatadas. A partir de ella se obtienen los metales por procesos de concentración y precipitación.

La disolución de los sulfuros de los metales pesados tiene lugar por la acción conjunta de varios procesos: por oxidación bacteriana de los compuestos reducidos de azufre (1) o del azufre elemental al ácido sulfúrico (2) y del Fe^{2+} al Fe^{3+} (3) así como también por oxidación química de las sales de los metales pesados insolubles a sulfatos metálicos solubles y azufre (4).

(1) $FeS_2 + 3\,{}^1/_2\,O_2 + H_2O \longrightarrow FeSO_4 + H_2SO_4$
(2) $S + 1\,{}^1/_2\,O_2 + H_2O \longrightarrow H_2SO_4$
(3) $2\,FeSO_4 + {}^1/_2\,O_2 + H_2SO_4 \longrightarrow Fe_2(SO_4)_3 + H_2O$
(4) $MeS + 2\,Fe^{3+} \longrightarrow Me^{2+} + 2\,Fe^{2+} + S$

Las bacterias aseguran por tanto los suministros de ácido sulfúrico y la regeneración del Fe^{3+}; ambos componentes son consumidos en la disolución de las menas.

Las transformaciones vienen determinadas por *Thiobacillus thiooxidans* y *T. ferrooxidans*. Las cepas implicadas presentan una tolerancia fuera de lo corriente frente a las concentraciones de Cu^{2+}, Co^{2+}, Zn^{2+}, Ni^{2+} y otros iones de metales pesados. En el proceso de la lixiviación participan también cepas de *Sulfolobus* que son capaces de oxidar tanto el hierro como el azufre.

Otras bacterias del hierro. Entre las bacterias del hierro mejor conocidas y más fácilmente reconocibles se pueden citar *Gallionella ferruginea* (Fig. 3.19) y *Leptothrix ochracea*. Se encuentran en hábitats como las canalizaciones de drenaje y en los torrentes de montaña en el interior de flóculos gruesos o depósitos de óxidos de hierro. Hasta hace pocos años no estaba claro si eran capaces de utilizar la energía liberada en la oxidación del Fe^{2+} al Fe^{3+} y crecer autotróficamente. Recientemente se ha demostrado la presencia de *ribulosa-bifosfato-carboxilasa* en *Gallionella*; hoy día se cuenta entre las bacterias litoautotróficas.

Además del hierro las bacterias pueden también oxidar el manganeso. La bacteria con vaina *Leptothrix discophorus* es capaz de oxidar el Mn^{2+} a Mn^{4+}. Tampoco es aún seguro si la energía liberada en esta oxidación es metabólicamente útil.

Autotrofia estricta. La autotrofia estricta es una expresión de una adaptación y especialización extrema a la respiración de un sustrato inorgánico. Para explicar este fenómeno se han ideado y comprobado distintas hipótesis:

1. En primer lugar se puede partir de la idea de que el ciclo de los ácidos tricarboxílicos no es imprescindible para la oxidación de un sustrato orgánico, de forma semejante a lo que sucede en la fermentación. Los equivalentes de reducción se obtienen por la oxidación de un sustrato inorgánico y se transportan a la cadena respiratoria. Únicamente deben permanecer las funciones sintéticas del ciclo de los ácidos tricarboxílicos (suministros de 2-oxoglutarato y succinato). Para ello no es necesario el enzima *2-oxoglutarato-deshidrogenasa*. Se ha comprobado que esta actividad enzimática no se presenta en una serie de bacterias autótrofas estrictas. En muchas bacterias autótrofas facultativas que hayan crecido con el sustrato inorgánico como fuente de energía tampoco puede demostrarse la presencia de este enzima. Un mutante de una bacteria autótrofa facultativa que haya perdido la capacidad para sintetizar la *2-oxoglutarato-deshidrogenasa* se comportaría entonces como una bacteria autótrofa estricta.

2. Como en las bacterias nitrificantes y en las oxidadoras del azufre, del sulfito y del hierro se presenta una cadena respiratoria "bifurcada", parece posible que en una bacteria autótrofa estricta se dé un fragmento de la cadena respiratoria que sea irreversible, que impida la función normal de la cadena respiratoria, la oxidación del $NADH_2$; este fragmento se utilizaría únicamente para el transporte inverso de electrones. Un impedimento de esta irreversibilidad, probablemente por regulación enzimática, serviría también para la conservación del poder reductor ($NADH_2$), que requiere un gran consumo energético.

Hasta el momento no puede darse una explicación conjunta de la autotrofia estricta ya que puede tener causas distintas en los diferentes grupos fisiológicos.

11.4 Oxidación del hidrógeno molecular

El hidrógeno se forma durante la degradación anaeróbica de las sustancias orgánicas en los sedimentos de las aguas y en los microhábitats anaeróbicos de los suelos. Son muchas las bacterias capaces de utilizar este hidrógeno. Gran parte de este hidrógeno es utilizado ya por aquellas bacterias que viven asociadas a los organismos fermentadores productores de hidrógeno, reduciendo con el H_2 el sulfato hasta el sulfuro o el anhídrido carbónico hasta metano (véase pág. 352 y siguientes). Existen algunos representantes de casi todos los grupos bacterianos capaces de regenerar ATP en una fosforilación en el transporte de electrones bajo condiciones anaeróbicas ("respiración anaeróbica") y pueden utilizar el hidrógeno como dador de hidrógenos (Cap. 9).

El hidrógeno también se produce en los ecosistemas bien aireados, como por ejemplo, el suelo sobre el que crecen leguminosas (soja, habas, tréboles). Procede de la reacción de la *nitrogenasa* (pág. 448) y difunde al entorno a partir de los bacteroides de los nódulos radicales, muchos de ellos incapaces de sintetizar *hidrogenasas*.

Bacterias anaeróbicas quimiolitotróficas

dador inorgánico de electrones y producto de reducción	denominación del grupo	especies representativas
$\boxed{H_2} \xrightarrow{CO_2} \boxed{CH_4}$	respiración de carbonato, metanogénicas	*Methanobacterium thermoautotrophicum*
$\boxed{H_2} \xrightarrow{CO_2} \boxed{CH_3\text{-}COOH}$	respiración de carbonato, acetogénicas	*Acetobacterium woodii*
$\boxed{H_2} \xrightarrow{SO_4^{2-}} \boxed{H_2S}$	respiración de sulfato, sulfurogénicas	*Desulfovibrio desulfuricans*
$\boxed{H_2} \xrightarrow{S^0} \boxed{H_2S}$	respiración de azufre, sulfurogénicas	*Desulfuromonas acetoxidans*
$\boxed{H_2} \xrightarrow{NO_3^-} \boxed{N_2}$	respiración de nitrato, desnitrificación	*Paracoccus denitrificans*
$\boxed{CO} \xrightarrow{NO_3^-} \boxed{N_2}$	respiración de nitrato, desnitrificación	*Pseudomonas carboxidovorans*
$\boxed{H_2} \xrightarrow{SO_4^{2-}} \boxed{H_2S}$	respiración de sulfato, sulfurogénicas	*Desulfobacterium autotrophicum*

Bacterias aeróbicas oxidadoras del hidrógeno

Se reúnen bajo el nombre de bacterias aeróbicas oxidadoras del hidrógeno (también bacterias del gas detonante) a las que son capaces de oxidar el hidrógeno en condiciones aeróbicas con el oxígeno como aceptor terminal de electrones. Todas pueden fijar anhídrido carbónico: son por tanto autótrofas. Por otra parte, todos los representantes de este grupo son capaces de utilizar sustratos orgánicos. Estas bacterias son por tanto quimiolitoautótrofos facultativos. Algunas bacterias del hidrógeno son capaces también de oxidar el monóxido de carbono y de crecer con éste como único dador de electrones y como única fuente de carbono.

Aislamiento y crecimiento. Las bacterias aeróbicas del hidrógeno crecen sobre medios de cultivo sencillos que contengan únicamente sales minerales bajo una mezcla gaseosa del 70% H_2 + 20% O_2 + 10% CO_2 (en volumen). Transforman a los componentes gaseosos en una relación estequiométrica aproximadamente igual a la siguiente:

$$6\,H_2 + 2\,O_2 + CO_2 \longrightarrow (CH_2O)^* + 5\,H_2O$$

Bajo estas condiciones pueden enriquecerse y aislarse fácilmente las bacterias a partir de muestras de suelos y aguas. A ellas pertenecen los organismos autótrofos de crecimiento más rápido. Las cepas mesófilas crecen auxotróficamente con un tiempo de duplicación de tres horas, las termófi-

---

* (CH_2O) indica aproximadamente la composición de la sustancia celular a base de C, H y O.

Tab. 11.4 Algunas especies de bacterias aeróbicas oxidadoras del hidrógeno.

Especies	*Hidrogenasa*		Fijación de nitrógeno	Tinción de Gram
	soluble	particulada (ligada a membranas)		
Alcaligenes eutrophus	+	+	–	–
Pseudomonas facilis	–	+	–	–
Pseudomonas saccharophila	–	+	–	–
Pseudomonas carboxidovorans	–	+	–	–
Pseudomonas pseudoflava	–	+	–	–
Pseudomonas carboxidoflava	–	+	–	–
Aquaspirillum autotrophicum	–	+	–	–
Paracoccus denitrificans	–	+	–	–
Xanthobacter autotrophicus	–	+	+	–
Nocardia opaca	+	–	–	+
Mycobacterium gordonae	–	+	–	+
Bacillus sp.	–	+	–	+

las con un tiempo de duplicación de una hora. Algunas cepas crecen heterotróficamente a mayor velocidad. En condiciones apropiadas de crecimiento se obtienen rendimientos celulares de aproximadamente 20 g de masa seca/litro de medio de cultivo.

Sistemática. Desde el punto de vista taxonómico las bacterias aeróbicas del hidrógeno representan un grupo extraordinariamente heterogéneo. La mayoría de las especies se ordenan en géneros Gram negativos: *Pseudomonas*, *Alcaligenes*, *Aquaspirillum*, *Paracoccus* y *Xanthobacter*; otros pertenecen a géneros Gram positivos: *Nocardia*, *Mycobacterium* y *Bacillus* (Tab. 11.4). Recientemente se ha demostrado también la capacidad para crecer autotróficamente con hidrógeno en otros géneros (*Rhizobium*, *Derxia*). Según esto, la posesión de los enzimas para la activación del H_2 y para la fijación del CO_2 está expandida entre representantes de varios grupos taxonómicos bacterianos.

Utilización del hidrógeno y metabolismo energético. El hidrógeno entra en el metabolismo a través de hidrogenasas. En las bacterias aeróbicas del hidrógeno aparecen dos tipos de hidrogenasas: una localizada en el citoplasma, soluble, una *hidrogenasa* que reduce al NAD (*H_2-NAD-óxido-reductasa*) y otras hidrogenasas particuladas ligadas a membranas. Tan sólo unas pocas bacterias (*Alcaligenes eutrophus*, *A. hidrogenophilus*) disponen de los dos tipos de hidrogenasas; *Nocardia* dispone solamente del enzima soluble y la gran mayoría de las bacterias del hidrógeno disponen únicamente del enzima particulado. Ambos enzimas pueden transferir el hidrógeno a la cadena respiratoria. El proceso de la regeneración del ATP es muy eficiente. Desde el punto de vista de sus componentes, las cadenas respiratorias de *Alcaligenes eutrophus* así como de *Paracoccus denitrificans* coinciden ampliamente con la de las mitocondrias.

Nutrición heterótrofa y mixotrofa. Muchas bacterias del hidrógeno degradan las hexosas y el gluconato a través de la vía de ENTNER-DOUDOROFF y oxidan este sustrato hasta CO_2 y H_2O. Son capaces de utilizar también un gran número de distintos compuestos orgánicos, entre ellos ácidos grasos ramificados, sistemas aromáticos y heterocíclicos, e incluso la testosterona. Como polímeros de reserva se presentan el poli-ß-hidroxibutirato y el glucógeno.

Cuando algunas bacterias del hidrógeno disponen simultáneamente del sustrato inorgánico (anhídrido carbónico e hidrógeno) y de un sustrato orgánico, entonces pueden nutrirse de forma mixotrófica, esto es, el nutriente orgánico puede asimilarse para obtener material celular y la energía necesaria para los procesos sintéticos puede provenir de la oxidación del H_2. Por ello, bajo estas condiciones los nutrientes orgánicos no tienen que oxidarse totalmente. La capacidad de nutrirse mixotróficamente está extendida en muchos organismos autótrofos facultativos, en los que la energía necesaria para la síntesis se obtiene por la oxidación de compuestos inorgánicos reducidos (p. ej. sulfuro de hidrógeno o azufre en las bacterias del azufre) o por fotosíntesis (algas verdes y plantas).

Regulación de la utilización del sustrato. En algunas bacterias del hidrógeno la utilización de los sustratos está sometida a una regulación muy estrecha. Por ejemplo, células crecidas autotróficamente de *Alcaligenes eutrophus* no disponen de los enzimas necesarios para la utilización de la fructosa. Si se inoculan estas células en un medio de cultivo con fructosa y se incuba en presencia de aire, se formarán los enzimas de la vía de ENTNER-DOUDOROFF, y las células crecerán. Sin embargo, si se incuba bajo una mezcla gaseosa de 80% de H_2 y 20% de O_2 no tiene lugar esta síntesis enzimática, y las células no son capaces de crecer. El hidrógeno reprime por tanto la formación de los enzimas necesarios para la degradación de la fructosa. Si para un experimento de este tipo se cultivan células que dispongan tanto de los enzimas para la degradación de la fructosa como de las hidrogenasas, y se incuban bajo una mezcla gaseosa de H_2 + O_2 la degradación de la fructosa tendrá lugar a unas tasas muy bajas; el H_2 inhibe la degradación de la fructosa. El punto atacado es el enzima *glucosa-6-fosfato-deshidrogenasa.* En presencia de H_2 y O_2 las células pueden obtener ATP y $NADH_2$. Ambos metabolitos inhiben a la *glucosa-6-fosfato-deshidrogenasa.* Esta disminución drástica en la tasa de la degradación de la fructosa *in vivo* se debe a la inhibición de este enzima por el $NADH_2$.

En estos experimentos se puso de manifiesto que la *glucosa-6-fosfato-deshidrogenasa* es el enzima regulador de la vía de ENTNER-DOUDOROFF; su función es análoga a la de la *fosfofructoquinasa* en la vía de la fructosabifosfato (pág. 572 y sig.).

Bacterias utilizadoras del monóxido de carbono (carboxidobacterias). El monóxido de carbono se forma en la naturaleza tanto bajo condiciones aeróbicas como anaeróbicas. Aún no se sabe con detalle cuáles son los microorganismos implicados ni cuáles son las transformaciones bioquímicas que tienen lugar. Se sabe, no obstante, que el monóxido de carbono puede ser utilizado por varias especies bacterianas que lo oxidan a anhídrido carbónico. Son únicamente bacterias aeróbicas las que son capaces de crecer con monóxido de carbono como único dador de electrones y como única fuente de carbono. *Pseudomonas carboxidovorans* transforma al monóxido de carbono durante el crecimiento según la siguiente ecuación:

$$7\,CO + 2^1/_2\,O_2 + H_2O \longrightarrow (CH_2O) + 6\,CO_2$$

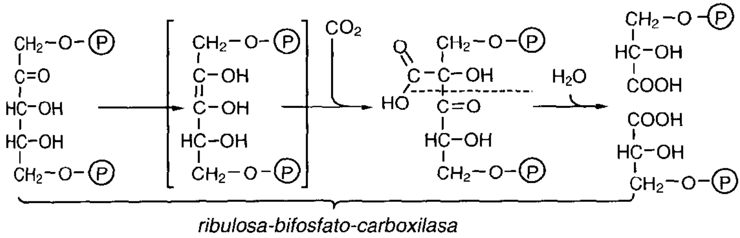
La asimilación del carbono tiene lugar por fijación del anhídrido carbónico a través del ciclo de la ribulosabifosfato. Las bacterias oxidadoras del monóxido de carbono llamadas también carboxidobacterias, disponen de una *hidrogenasa* particulada, ligada a membranas, y son capaces de crecer también como bacterias del hidrógeno.

11.5 Fijación del anhídrico carbónico

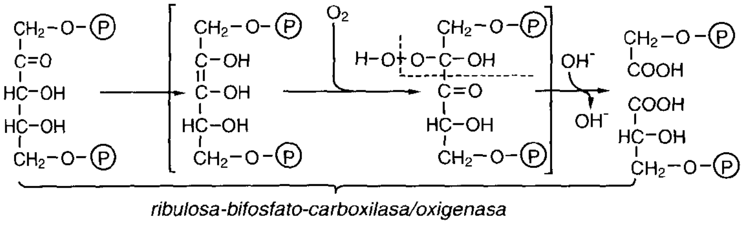
La mayoría de los organismos capaces de crecer con el anhídrido carbónico como única fuente de carbono lo fijan a través del **ciclo de la ribulosabifosfato (ciclo** de CALVIN-BASSHAM). Entre estos organismos se cuentan las bacterias quimiolitoautotróficas aeróbicas, prácticamente todas las bacterias fotosintéticas, las cianobacterias y las plantas verdes. Este ciclo no participa con toda seguridad en la asimilación del CO_2 por las bacterias metanogénicas y acetogénicas, que según la definición pertenecerían también al grupo de las bacterias quimiolitoautótrofas.

Hay dos enzimas característicos del ciclo de la ribulosabifosfato y que no participan en otras vías metabólicas; éstos son, la *fosforribulosa-quinasa* y la *ribulosa-bifosfato-carboxilasa*. Este último enzima es la proteína que predomina cuantitativamente en nuestro planeta (comparada con otras proteínas). El ciclo representa un proceso reductor en el que el anhídrido carbónico se reduce al nivel de los hidratos de carbono. Pueden diferenciarse tres fases: 1. la reacción de carboxilación; 2. la reducción, y 3. la regeneración de la molécula aceptora del CO_2.

Reacción de carboxilación. La ribulosa-1,5-bifosfato se transforma en dos moléculas de 3-fosfoglicerato por fijación del dióxido de carbono a través de la *ribulosa-bifosfato-carboxilasa*:


CH₂–O–Ⓟ
C=O
HC–OH
HC–OH
CH₂–O–Ⓟ
C–OH
C–OH
CO₂
HO
H₂O
COOH
ribulosa-bifosfato-carboxilasa

Este enzima cataliza una segunda reacción. En ausencia de anhídrido carbónico y en presencia de oxígeno este enzima transforma a la ribulosabifosfato en fosfoglicolato y 3-fosfoglicerato mediante una oxigenación (actividad *oxigenasa*). Esta reacción de formación de glicolato participa en las bacterias autótrofas y también en las plantas verdes, y por tanto interviene en la fotorrespiración.


CH₂–O–Ⓟ
C=O
HC–OH
HC–OH
CH₂–O–Ⓟ
C–OH
C–OH
O₂
H–O–O–C–OH
OH⁻
COOH
ribulosa-bifosfato-carboxilasa/oxigenasa

Reacción de reducción. A la reacción de carboxilación le sigue la de reducción del grupo carboxílico del 3-fosfoglicerato hasta dar el grupo del aldehídico; en esta reacción participan aquellas reacciones ya conocidas de la fructosabifosfato (pág. 248) esto es, la fosforilación con ATP mediante la *3-fosfoglicerato-quinasa* y la reducción con el NAD(P)H_2 por la *glicerinaldehído-3-fosfato-deshidrogenasa*. Esta reacción va ligada en las bacterias al NAD y en las plantas al NADP.

La reducción del 3-fosfoglicerato es en realidad el paso que consume energía y poder reductor en la fijación del CO_2. Los pasos siguientes son energéticamente insignificantes y tienen lugar aproximadamente al mismo nivel energético.

Regeneración de la molécula aceptora del CO_2. El glicerinaldehído-3-fosfato está en equilibrio con la dihidroxiacetonafosfato mediante la *triosafosfato-isomerasa,* y ambas triosasfosfato están a su vez en equilibrio con la fructosa-1,6-bifosfato a través de la *fructosa-bifosfato-aldolasa.*

La fructosabifosfato se defosforila a fructosa-6-fosfato a través de la *fructosa-bifosfatasa.* En la transformación de una molécula de fructosa-6-fosfato y tres moléculas de triosafosfato en tres moléculas de ribulosa-5-fosfato participan algunos de los enzimas conocidos ya del ciclo oxidativo de la pentosafosfato, así como también otros enzimas. La secuencia de reacciones se inicia por la *transcetolasa* (Fig. 11.2, parte derecha). Este enzima cataliza la transferencia de un grupo glicólico de una cetosamonofosfato hasta una aldosafosfato. El glicolaldehído se fija transitoriamente al coenzima tiaminadifosfato (= tiaminapirofosfato) y se considera como "glicolaldehído activo".

La tetrosafosfato formada en el curso de la reacción de la *transcetolasa* (eritrosa-4-fosfato) se transforma en la reacción de la *aldolasa* con la dihidroxiacetonafosfato hasta sedoheptulosa-1,7-bifosfato. Ésta se defosforila en la posición 1 mediante una *fructosa-bifosfatasa* con formación de sedoheptulosa-7-fosfato (Shu-7-P). Este paso, la hidrólisis de un éster fosfórico, es irreversible. Determina que toda la secuencia de reacciones tenga un carácter de irreversibilidad y proporciona la posibilidad de regular el flujo de metabolitos en este punto. En las plantas se ha establecido con toda

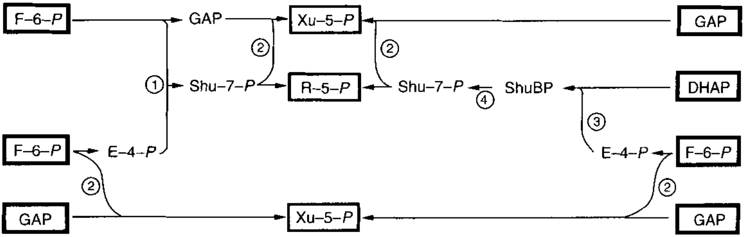


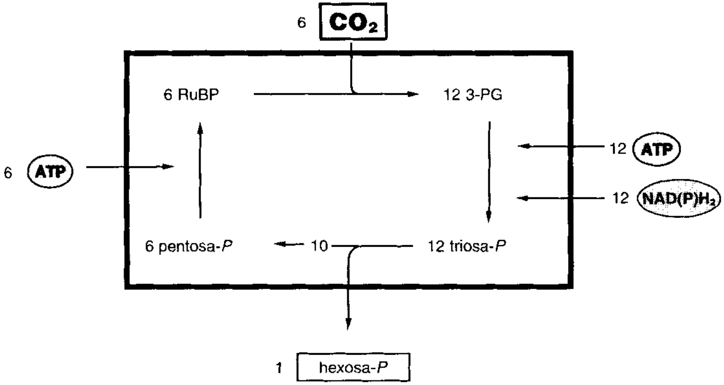
Fig. 11.2 Esquema de las dos posibilidades para regenerar las pentosasfosfato a partir de triosasfosfato y fructosa-6-fosfato. La parte izquierda resume los pasos de reacción implicados en la síntesis de las pentosas de los ácidos nucleicos (ribosa, desoxirribosa) en los que participa la *transaldolasa.* La parte derecha se ocupa de las reacciones implicadas en la regeneración del aceptor de CO_2 (ribulosa-1,5-bifosfato) en las que participa la sedoheptulosa-1,7-bifosfato y la *aldolasa,* pero no la *transaldolasa.* Abreviaturas: F-6-P = fructosa-6-fosfato; GAP = glicerinaldehído-3-fosfato; DHAP = dihidroxiacetonafosfato; E-4-P = eritrosa-4-fosfato; Shu-7-P = sedoheptulosa-7-fosfato; ShuBP = sedoheptulosa-1,7-bifosfato; Xu-5-P = xilulosa-5-fosfato; R-5-P = ribosa-5-fosfato; (1) *transaldolasa*; (2) *transcetolasa*; (3) *fructosa-bifosfato-aldolasa*; (4) *fructosa-bifosfatasa.*

seguridad que en la fotosíntesis la regeneración de la ribulosa-5-fosfato tiene lugar a través de la sedoheptulosa-1,7-bifosfato (Fig. 11.2, parte derecha), pero que la síntesis de las pentosasfosfato tiene lugar en la oscuridad a través de la reacción de la *transaldolasa* directamente hasta sedoheptulosa-7-fosfato (Fig. 11.2, parte izquierda).

Mediante la *transcetolasa* se transfiere un grupo glicólico de la sedoheptulosa-7-fosfato al glicerinaldehído-3-fosfato, apareciendo entonces dos pentosasfosfato. Las pentosasfosfato, ribosa-5-fosfato y la xilulosa-5-fosfato están en equilibrio enzimático con la ribulosa-5-fosfato. La fosforilación de la ribulosa-5-fosfato con el ATP mediante la *fosforribulosa-quinasa* hasta ribulosa-1,5-bifosfato es la última reacción del ciclo de la ribulosa-bifosfato.

Balance del ciclo de la ribulosabifosfato. Para la síntesis de 1 mol de hexosa a partir de 6 moles de anhídrido carbónico hace falta que el ciclo se recorra seis veces. El balance del ciclo de la ribulosabifosfato en la fijación del CO_2 es el siguiente:

$$6\ CO_2 + 18\ ATP + 12\ NAD(P)H_2 \longrightarrow F\text{-}6\text{-}P + 18\ ADP + 12\ NAD(P) + 17\ P_i$$



La representación cerrada del ciclo no debe confundirnos, ya que muchas sustancias intermediarias son puntos de partida para la síntesis de componentes celulares importantes: el 3-fosfoglicerato conduce a piruvato y acetil-CoA, la eritrosa-4-fosfato a la síntesis de aminoácidos aromáticos, la ribosa-5-fosfato a la síntesis de nucleótidos y la hexosafosfato a la síntesis de polímeros. La **regulación** de la actividad de algunos de los enzimas implicados asegura aparentemente, por una parte que el metabolismo celular no pierda demasiada energía en esta fijación del CO_2 enormemente

Tab. 11.5 Las tres vías de la fijación autotrófica de CO_2.

Vía reductiva del acetil-CoA	Ciclo reductivo de los ácidos tricarboxílicos	Ciclo de Calvin
Fermentadores homoacéticos *Clostridium thermoaceticum* *Acetobacter woodii* *Sporomusa* sp.	Bacterias verdes del azufre *Chlorobium limicola*	Bacterias anoxigénicas fototróficas *Chromatium vinosum* *Rhodospirillum rubrum*
Mayoría de bacterias reductoras de sulfatos *Desulfobacterium autotrophicum* *Desulfovibrio baarsii*	Bacterias oxidadoras del hidrógeno termófilas *Hydrogenobacter thermophilus*	Bacterias quimiolitotróficas Nitrificantes, oxidadores del azufre Bacterias del hidrógeno y carboxidobacterias Oxidadores del hierro
Bacterias metanogénicas *Methanobacterium thermoautotrophicum* *Methanosarcina barkeri*	Algunas bacterias reductoras de sulfatos *Desulfobacter hydrogenophilus*	Bacterias, algas y vegetales superiores fototróficos oxigénicos

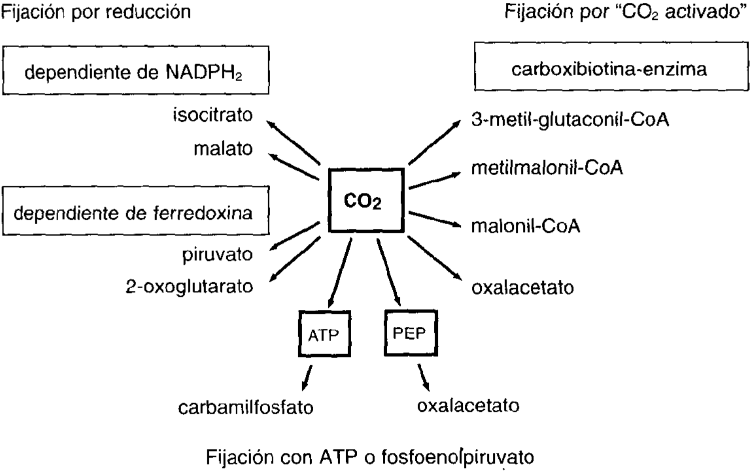
cara, y por otra parte, que el ciclo no se detenga cuando se extraen de él productos intermediarios para la síntesis del material celular (pág. 576).

Otras vías de la fijación autotrófica del anhídrido carbónico. La fijación del anhídrido carbónico a través del ciclo de la ribulosabifosfato constituye actualmente la serie de reacciones más importante para la síntesis de materia orgánica a partir del CO_2, pero no es la única (Tab. 11.5). Las bacterias anaeróbicas autotróficas disponen de otros dos mecanismos para la asimilación del CO_2. Las bacterias metanogénicas, las acetogénicas y las reductoras de sulfatos (sulfurogénicas) que pueden utilizar el hidrógeno o el monóxido de carbono como dadores de H, reducen el CO_2 a través de la **vía reductiva del acetil-CoA**, esto es, hasta acetil-CoA y piruvato (pág. 356). Estos últimos se incorporan a las vías centrales de síntesis por las reacciones ya conocidas.

Las bacterias verdes del azufre (*Chlorobium thiosulphatophilum*) fijan el CO_2 exclusivamente a través de reacciones del **ciclo reductor de los ácidos tricarboxílicos**; el CO_2 se fija por carboxilación reductiva del succinil-CoA.

Una comparación de los tres tipos de fijación autotrófica del CO_2 permite reconocer que los procesos anaeróbicos son mucho más económicos que el aeróbico. La síntesis de 1 mol de triosafosfato a partir de 3 moles de CO_2 requiere probablemente sólo 3 moles de ATP por la vía reductiva del acetil-CoA, unos 5 moles de ATP por el ciclo reductivo de los ácidos tricarboxílicos y 9 moles de ATP por el ciclo de la ribulosabifosfato carboxilasa.

Reacciones generales de fijación del anhídrido carbónico. Hemos indicado ya antes varias veces que los organismos heterótrofos necesitan también anhídrido carbónico y que lo incluyen en su metabolismo. Ya hemos insistido en el papel de la carboxilación del piruvato y del fosfoenolpiruvato en el suministro para el ciclo de los ácidos tricarboxílicos. En el siguiente esquema se resumen aquellos compuestos intermediarios del metabolismo en los que puede incorporarse anhídrido carbónico.


Fijación por reducción
Fijación por "CO₂ activado"
dependiente de NADPH₂
carboxibiotina-enzima
isocitrato
malato
3-metil-glutaconil-CoA
metilmalonil-CoA
CO₂
dependiente de ferredoxina
malonil-CoA
piruvato
2-oxoglutarato
oxalacetato
ATP
PEP
carbamilfosfato
oxalacetato
Fijación con ATP o fosfoenolpiruvato

Las reacciones de fijación del CO_2 indicadas desempeñan distintos papeles en los diferentes organismos. Algunas sirven para la activación de los metabolitos para el suministro de las vías metabólicas centrales. Las reacciones reductoras de carboxilación dependientes de la ferredoxina se han extendido exclusivamente en algunas bacterias anaeróbicas fototróficas.

12. Bacterias fototróficas y fotosíntesis

La capacidad de utilizar la **luz como fuente de energía** para el crecimiento es propia de dos grupos de bacterias. Ambos se diferencian fundamentalmente. Las **bacterias rojas y verdes** pueden considerarse como reliquias de los primeros tiempos de la evolución de la fotosíntesis. No pueden utilizar el agua como dador de hidrógenos (tal como hacen las plantas verdes) sino que necesitan dadores de hidrógenos fuertemente reducidos (SH_2, H_2 o materia orgánica). Como consecuencia estas bacterias no liberan oxígeno durante la fotosíntesis: desarrollan una **fotosíntesis anoxigénica**. Son bacterias acuáticas típicas, extendidas en las aguas dulces y marinas. Son de color rojo, naranja o verde, y unicelulares; la coloración viene determinada por su contenido en bacterioclorofilas y carotenoides.

Las **cianobacterias** utilizan el agua como dador de hidrógenos y liberan oxígeno en presencia de luz: desarrollan una **fotosíntesis oxigénica**. El sistema de pigmentos incluye a la clorofila a, a carotenoides y a ficobilinas. Como el proceso de su fotosíntesis es fundamentalmente igual al de las plantas verdes, anteriormente se trataban conjuntamente con los eucariotas fotosintéticos y se las ha denominado algas verde-azuladas o cianofíceas. Desde el punto de vista de su estructura celular son sin embargo procariotas típicos. Las cianobacterias se trataron ya en profundidad en el apartado 3.21 y aquí ya no las trataremos más.

12.1 Bacterias rojas del azufre, bacterias rojas sin azufre y bacterias verdes del azufre

Las bacterias fotosintéticas que realizan una fotosíntesis anoxigénica se dividen en tres grandes grupos: las bacterias rojas del azufre y sin azufre, y las bacterias verdes del azufre. Los representantes de estos tres grupos se diferencian entre sí esencialmente por sus características citológicas y fisiológicas, así como por sus pigmentos (véase Tab. 12.1 y también Fig. 12.1, 12.6 y 12.10)

Todos los representantes de las bacterias rojas tienen en común que el aparato fotosintético (sistema de antena o captador de la luz y los centros de reacción) está localizado en membranas citoplasmáticas (tilacoides) originados en invaginaciones de la membrana citoplasmática (Fig. 2.23 y 2.24). La morfología de las estructuras de los tilacoides puede ser muy

Tab. 12.1 Las cuatro familias de bacterias fototrofas anaeróbicas.

		Grupo	Especie tipo	Características del grupo						
				Crecimiento aeróbico oscuridad	Crecimiento anaeróbico luz	Oxidación del SH_2	Depósitos de azufre	Pigmentos	Aparato fotosintético	Suplementos
Bacterias fototróficas anaeróbicas	Bacterias rojas	Cromatiáceas (bacterias rojas del azufre)	*Chromatium vinosum*	–	+	+	intracelular	Bcl*a (Bcl b)	Tilacoides	Ninguno o B_{12}
		Rodospiriláceas (bacterias rojas sin azufre)	*Rhodospirillum rubrum*	(+)	+	– (+)	(extracelular)	Bcl a (Bcl b)	Tilacoides	pAB* tiamina, biotina, ácido nicotínico
	Bacterias verdes del S	Clorobiáceas (bacterias verdes del azufre)	*Chlorobium limicola*	–	+	+	extracelular	Bcl a Bcl c Bcl d Bcl e	Mc* Vesículas	Ninguno o B_{12}
		Cloroflexáceas (grupo de cloroflexus)	*Chloroflexus aurantiacus*	+	+	(+)	–	Bcl a Bcl c	Mc* Vesículas	

* pAB = ácido 4-aminobenzoico; Bcl = bacterioclorofila; Mc = membrana citoplasmática.

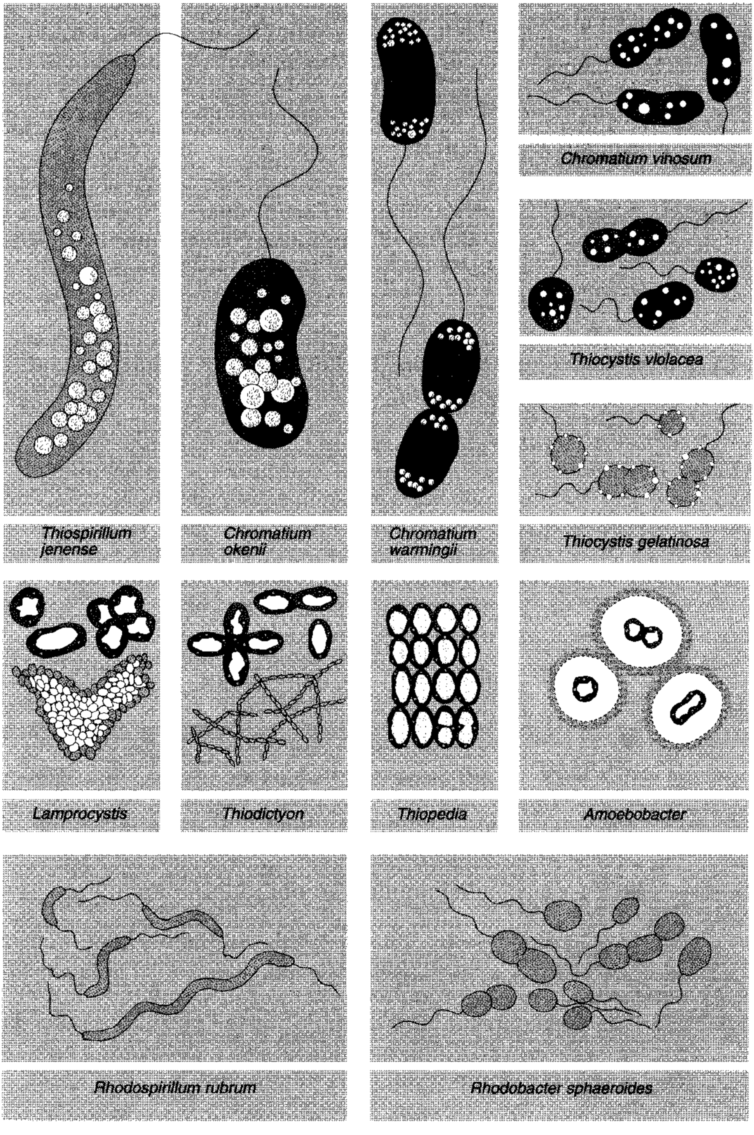

Chromatium vinosum
Thiocystis violacea
Thiospirillum jenense
Chromatium okenii
Chromatium warmingii
Thiocystis gelatinosa
Lamprocystis
Thiodictyon
Thiopedia
Amoebobacter
Rhodospirillum rubrum
Rhodobacter sphaeroides

Fig. 12.1 Algunas bacterias rojas del azufre (Cromatiáceas) y otras bacterias rojas sin azufre (Rodospiriláceas).

diversa según las distintas especies: existen formas vesiculares, tubulares y lamelares (Fig. 2.23 y 2.24). Con muy pocas excepciones la bacterioclorofila a (bcl a) es la clorofila típica de este grupo bacteriano. Todas son capaces de fijar anhídrido carbónico a través del ciclo de la ribulosabifosfato y de utilizar compuestos orgánicos como dadores de hidrógeno y/o fuente de carbono.

Dentro de las bacterias rojas se diferencian dos familias desde el punto de vista de su capacidad para poder utilizar el azufre como dador de electrones: las bacterias rojas del azufre o Cromatiáceas (anteriormente Tiorrodáceas) y las bacterias rojas que no son del azufre o Rodospiriláceas (anteriormente Atiorrodáceas).

Cromatiáceas. La mayoría de las bacterias rojas del azufre se pueden reconocer fácilmente por el azufre que almacenan intracelularmente, las esferas de azufre birrefringente (Fig. 2.45, 12.2 y 12.3). *Chromatium okenii* (5 μm de ancho, 20 μm de largo) y *Thiospirillum jenense* (3,5 μm de ancho, 50 μm de largo) son los gigantes dentro de las bacterias (Fig. 12.1, 12.2 y 12.3). Desde siempre han captado la atención de los microscopistas y son objeto del estudio del movimiento flagelar y de los tactismos. Por sus dimensiones algo inferiores y por la localización polar de las esferas de azufre se diferencia *Chromatium warmingii* de *C. okenii*. Los *Chromatium* grandes tienen una apariencia arriñonada, mientras que las formas

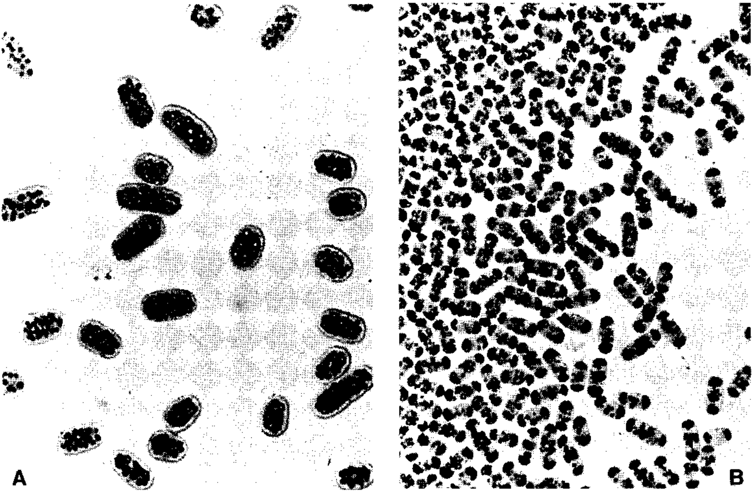


Fig. 12.2 ***Chromatium okenii*** **(A) y** ***Chromatium warmingii*** **(B).** Fotografías en campo claro. Aproximadamente 800 aumentos (Fotos N. Pfennig).

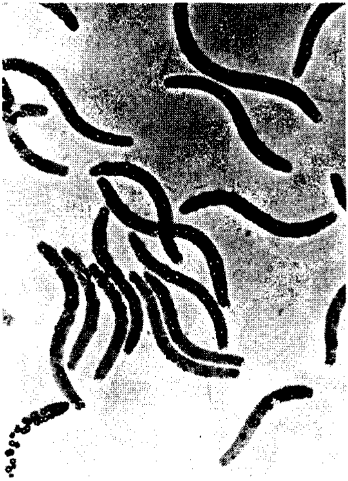


Fig. 12.3 ***Thiospirillum jenense* con flagelación monopolar politrica y con inclusiones de azufre.** Fotos en campo claro. Aproximadamente 700 aumentos (Foto N. PFENNIG).

pequeñas aparecen como bacilos cortos. Entre ellos se encuentra *Chromatium vinosum* cepa D, con el que se han realizado investigaciones esenciales acerca de la fotosíntesis bacteriana. El género *Thiocystis* (*T. violacea, T. gelatinosa*) se caracteriza por su forma cocoidal y por tratarse de células igualmente móviles. *Thiocapsa roseopersicina* y *T. pfernigii* son también cocoidales pero inmóviles. Muchas especies de Cromatiáceas disponen de vacuolas gaseosas. Entre ellas se cuentan *Lamprocystis roseopersicina*, células esféricas móviles y los géneros inmóviles *Amoebobacter* (cocoidal), *Thiopedia* (elíptica) y *Thiodictyon* (bacilar).

Como característica típica de las Cromatiáceas se considera el almacenamiento durante la oxidación del sulfuro de hidrógeno de un azufre intermediario. En las pertenecientes al género *Ectothiorhodospira* (*E. mobilis, E. halophila*) el azufre se almacena fuera de la célula y luego se oxida extracelularmente hasta sulfato.

Todas las Cromatiáceas disponen de tilacoides vesiculares (cromatóforos) que ocupan la mayoría de las veces la totalidad de la célula. Hasta ahora se conocen dos excepciones: especies de *Ectothiorhodospira* y *Thiocapsa pfennigii* que tienen tilacoides tubulares.

Rodospiriláceas. Casi todas las bacterias rojas que no son del azufre pueden ordenarse actualmente en cinco géneros. Las especies espiriladas pertenecen al género *Rhodospirillum*. Por su tamaño y color se distinguen *R. rubrum, R. fulvum* (Fig. 12.4), *R. molischianum* y *R. photometricum*. Las

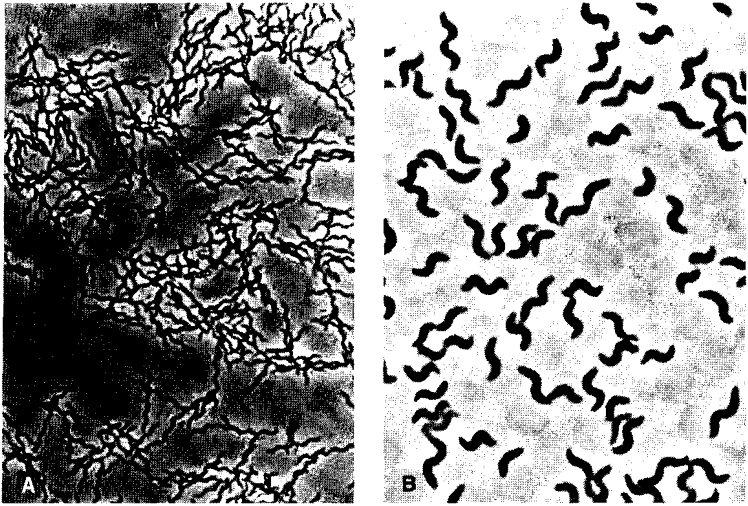


Fig. 12.4 ***Rhodospirillum rubrum*** **(A) y** ***Rhodospirillum fulvum*** **(B).** Fotos en campo claro, aproximadamente 1200 y 1800 aumentos.

especies bacilares se reunen en el género *Rhodopseudomonas* (*R. palustris*, *R. viridis*, *R. acidophila* y *R. sulfoviridis*) y en *Rhodobacter* (*R. capsulatus*, *R. sphaeroides* y *R. sulfidophilus*). Los bacilos curvados se han denominado *Rhodocyclus* (*R. purpureus*, *R. gelatinosus* y *R. tenuis*). Las bacterias casi esféricas móviles forman un género propio, *Rhodopila*, con una sola especie, *R. globiformis*. Las estructuras de los tilacoides en esta familia pueden presentar todas las formas posibles.

Adquieren una situación especial las especies *Rhodomicrobium vannielii* y *Rhodocyclus purpureus*. *Rhodomicrobium vannielii* (Fig. 12.5) se reproduce por formación de yemas, que pueden permanecer unidas a la célula materna mediante un pedúnculo en forma de hifa o bien pueden liberarse y desplazarse mediante una flagelación peritrica. *Rhodocyclus purpureus* es la única forma inmóvil de esta familia. Las células son semianulares. La membrana fotosintética es probablemente idéntica a la membrana citoplasmática, que sólo permite reconocer de forma aislada unas pequeñas invaginaciones.

El crecimiento de la mayoría de las bacterias rojas que no son del azufre está inhibido por el sulfuro de hidrógeno o incluso lo pueden utilizar como dador de hidrógenos para la fijación de CO_2. *Rhodopseudomonas sulfidophila* y *R. palustris* oxidan el sulfuro de hidrógeno hasta sulfato, sin que el azufre pueda aparecer como un producto intermediario.

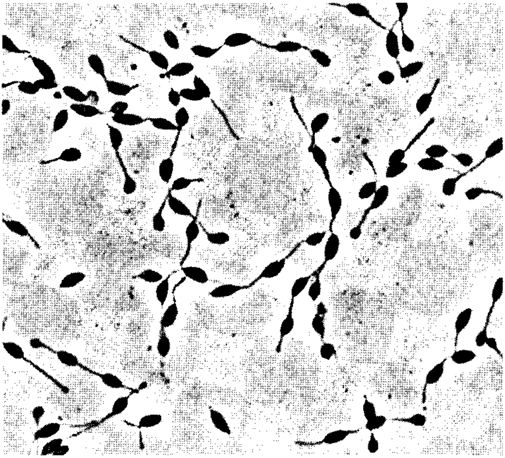


Fig. 12.5 ***Rhodomicrobium vannielii*, una bacteria roja sin azufre que forma yemas e hifas.** Fotografía en campo claro, aproximadamente 1200 aumentos (Foto N. Pfennig).

Bacterias verdes del azufre

Los pertenecientes a las bacterias verdes del azufre se caracterizan porque directamente adosados a la membrana citoplasmática disponen de unos orgánulos en los que se localizan los pigmentos, los llamados **clorosomas** (anteriormente vesículas de *Chlorobium*). En ellos están contenidas las bacterioclorofilas características de este grupo bacteriano (bcl c, d o e), el pigmento antena. Además, estas bacterias disponen de pequeñas cantidades de bcl a. Ésta está relacionada directamente con los centros de reacción fotosintéticos y localizada en la membrana citoplasmática. Las bacterias verdes del azufre se diferencian de las bacterias rojas por la ausencia de *ribulosabifosfato-carboxilasa.* Por tanto, no pueden fijar anhídrido carbónico a través del ciclo de la ribulosabifosfato. Las dos familias, Clorobiáceas y Cloroflexáceas de las bacterias verdes del azufre no están emparentadas entre sí filogenéticamente según los datos del RNAr 16S. También es diferente la pared celular, en las Clorobiáceas Gram negativa y en las Cloroflexáceas Gram positiva.

Clorobiáceas. Entre las bacterias verdes del azufre (Fig. 12.6 a 12.9) se cuentan formas verdes (*Chlorobium vibrioforme* y *C. limicola*), cepas de coloración parda (*Chlorobium phaeobacteroides*), agregados en forma de estrella (*Prosthecochloris*) y formas que determinan redes (*Pelodictyon clathratiforme*). *Chlorochromatium aggregatum* es una asociación sim-

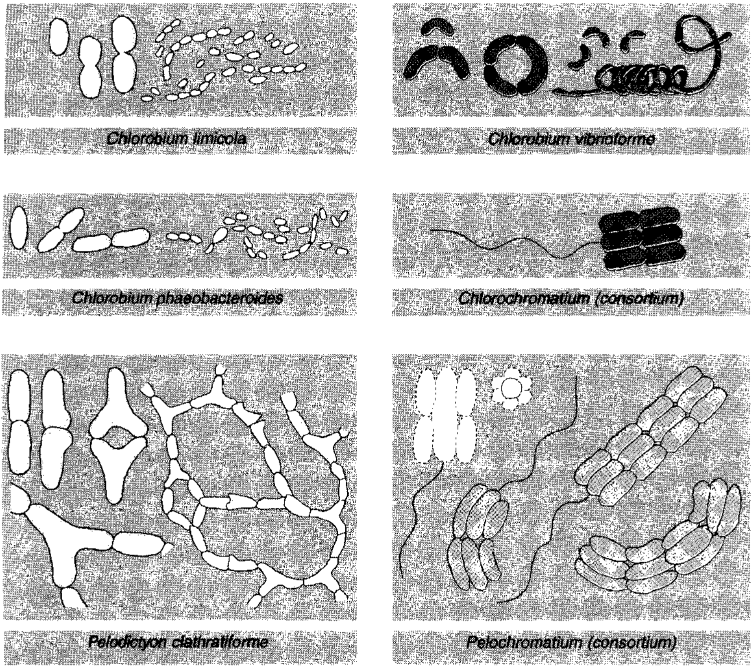

Chlorobium limicola
Chlorobium vibrioforme
Chlorobium phaeobacteroides
Chlorochromatium (consortium)
Pelodictyon clathratiforme
Pelochromatium (consortium)

Fig. 12.6 Bacterias verdes del azufre (Clorobiáceas).

biótica de dos especies bacterianas: un bacilo quimioorganotrofo incoloro, móvil por un largo flagelo en situación polar rodeado por bacterias fototróficas como ectosimbiontes. *Pelochromatium roseum* está constituido de la misma forma; las bacterias ectosimbióticas tienen una tonalidad pardusca. La bacteria marina *Chloroherpeton thalassium* se diferencia por su morfología filamentosa y el movimiento deslizante de las cepas de *Chlorobium*.

Cloroflexáceas. La bacteria fototrófica *Chloroflexus* pertenece por su tipo de movimiento a las bacterias filamentosas deslizantes, pero dispone de bacterioclorofilas c y a, así como de clorosomas, correspondientes a los de las bacterias verdes del azufre; *Chloroflexus* se diferencia de todos modos de las especies de *Chlorobium* por su capacidad de poder desarrollarse en condiciones aeróbicas heterotróficamente sobre medios de cultivo complejos y en presencia de la luz o en la oscuridad. En contraposición a las Clorobiáceas, el crecimiento fotoautótrofo con CO_2 y SH_2 casi

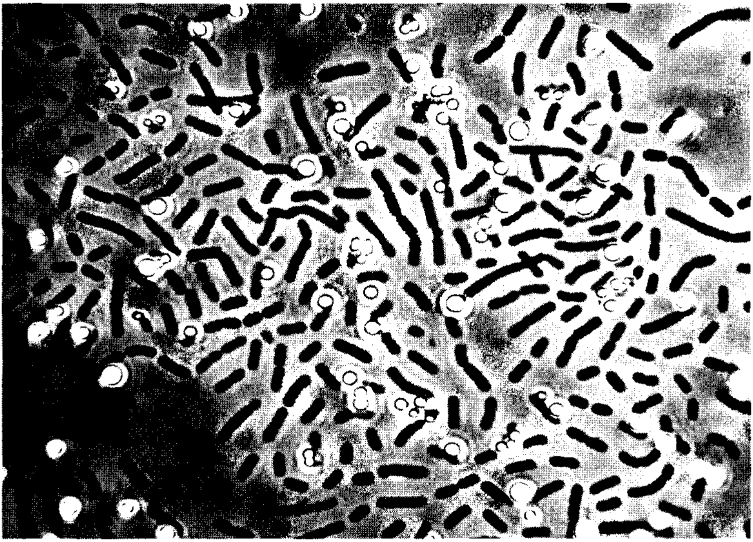


Fig. 12.7 ***Chlorobium limicola*, cultivo joven con depósitos extracelulares de azufre.** Fotografía en campo claro, aproximadamente 1000 aumentos (Foto N. PFENNIG).

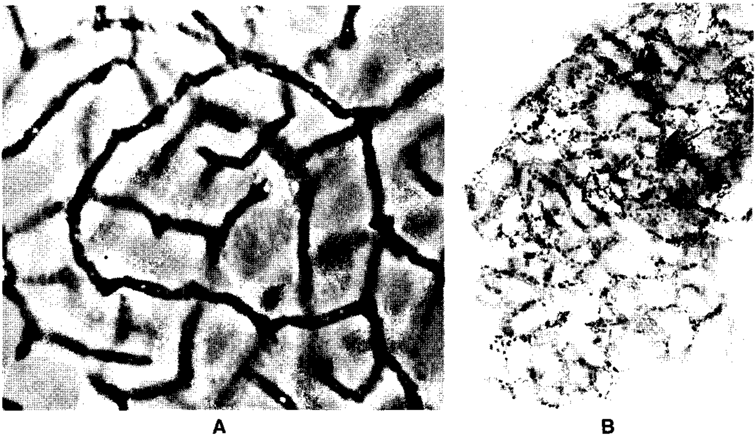


Fig. 12.8 ***Pelodictyon clathratiforme* (A) una bacteria verde del azufre que forma redes, y la bacteria roja del azufre *Thiodictyon elegans* (B) que forma redes más laxas.** Fotografías en campo claro, aumentos 1500 (A) y 400 (B) (Fotos N. PFENNIG).

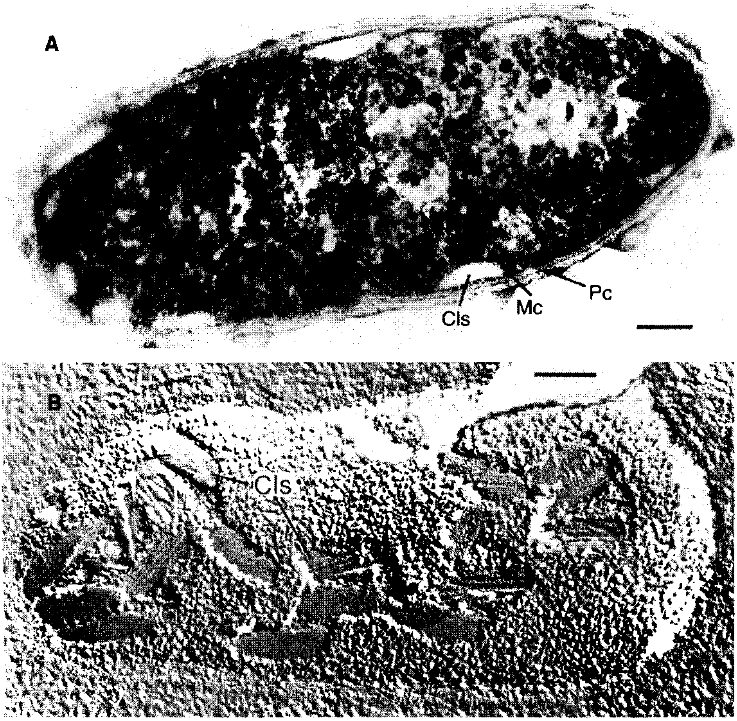


Fig. 12.9 Micrografías electrónicas de *Chlorobium limicola*. **A** Corte ultrafino, **B** clorosomas visualizables gracias a la criofractura. Cls = clorosomas; Mc = membrana citoplasmática; Pc = pared celular. La barra tiene 100 nm de longitud (Fotografías de STAEHELIN, L.A.; GOLECKI, J.R.; DREWS, G.: Biochim. Biophys. Acta 589 [1980] 30).

no es determinable. Por ello, las Cloroflexáceas son más bien fotoheterótrofas. *C. aurantiacus* es una bacteria extendida por todo el mundo; es el componente principal de los depósitos de coloración verde o naranja de los suelos de los arroyos de las fuentes termales.

Heliobacterias. Las heliobacterias constituyen un grupo totalmente nuevo y distinto de bacterias fototróficas anoxigénicas. Hasta ahora sólo se conocen tres representantes: *Heliobacterium* es una bacteria deslizante, *Heliospirillum* es un espirilo grande muy móvil y *Heliobacillus* es un bacilo móvil. Contienen bacterioclorofila g que se diferencia muy poco de la bcl a (Fig. 12.11). La diferencia básica frente a todas las bacterias rojas descritas hasta ahora (todas ellas Gram negativas) es su carácter Gram positivo y su situación en el árbol filogenético. Este último demuestra que se trata de un grupo propio de eubacterias próximas al género *Clostridium*.

12.1.1 Pigmentos del aparato fotosintético

Por su contenido en pigmentos fotosintéticos las bacterias fototrofas tienen en suspensiones densas coloración verde, verde-azul, púrpura o violeta, rojo, pardo o salmón. Estas distintas tonalidades se deben a la naturaleza y a la composición cuantitativa de los pigmentos. Los componentes de los pigmentos se ponen ya de manifiesto en los espectros de absorción de las células intactas (Fig. 12.10). Las clorofilas son las responsables de los picos de absorción en las regiones azul (< 450 nm) y en la zona roja e infrarroja del espectro (650-1100 nm). La absorción en la región de 400 a 500 nm está determinada principalmente por los carotenoides, y en las cianobacterias la región de 550 a 650 nm por las ficobiliproteínas.

Los distintos tipos de **clorofila** de los organismos fototrofos se diferencian entre sí esencialmente por la presencia o ausencia de dobles enlaces entre los átomos de carbono 3 y 4, y por los sustituyentes del anillo porfirínico (Fig. 12.11). Estas modificaciones son las responsables de los distintos máximos de absorción en el infrarrojo próximo. Son también claramente reconocibles en los espectros de las células enteras o de las membranas fotosintéticas aisladas, donde los pigmentos se presentan en forma de complejos específicos pigmento-proteína (Fig. 12.10). Así, el máximo principal de la clorofila a de las algas verdes y las cianobacterias se encuentra entre 680-685 nm, el de la bacterioclorofila c, d y e de las bacterias verdes del azufre y de *Chloroflexus* entre 715-755 nm, y en la bacterioclorofila a de la mayoría de las bacterias rojas entre 850-890 nm. Entre 1020 y 1035 nm absorbe la bacterioclorofila b, que hasta ahora únicamente se ha demostrado en células de *Rhodopseudomonas viridis*, *Ectothiorhodospira halochloris* y *Thiocapsa pfennigii*. La bcl a de las bacterias rojas se presenta en cuatro formas espectrales: B800, B820, B850 y B870-890. Las diferencias en la absorción se basan en el tipo de enlace y en la situación de la molécula de bcl en los complejos pigmento-clorofila del aparato fotosintético. El número de picos y la altura relativa de cada uno de ellos varían de una especie a otra y en muchos organismos pueden influirse según las condiciones de cultivo.

Las Clorobiáceas contienen, además de los componentes clorofílicos característicos para ellas, bcl c, d o e, y a veces también una pequeña cantidad de bcl a con un único pico a 810 nm. Por el contrario, en las células de *Chloroflexus* el espectro de la bcl a presenta claramente dos máximos a 808 y 868 nm.

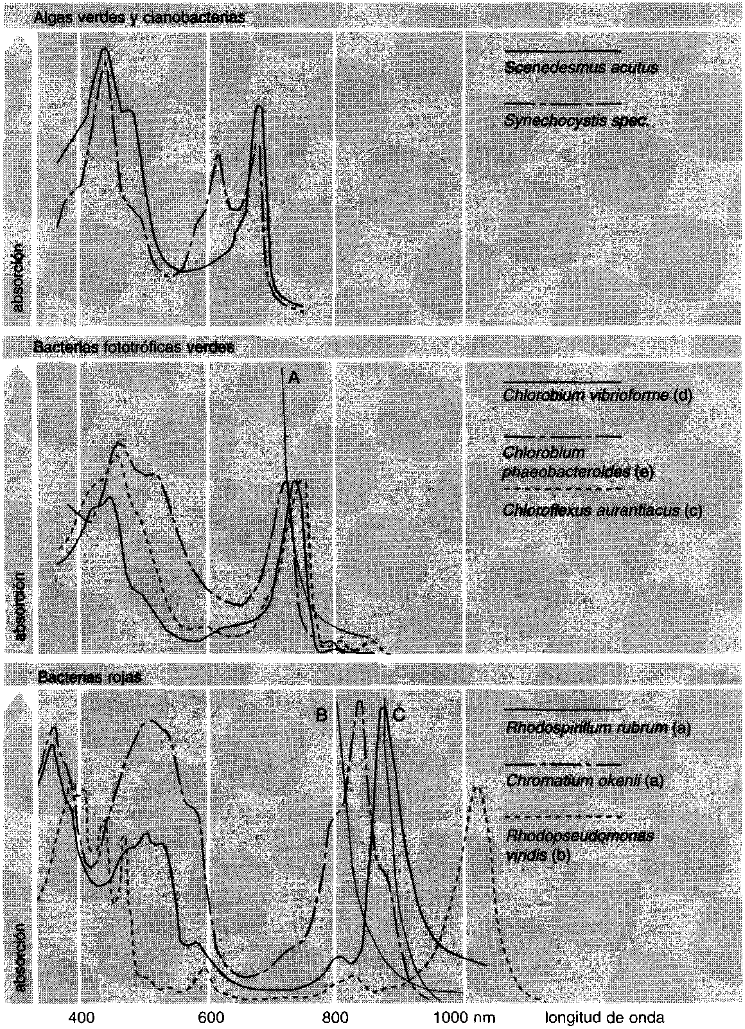
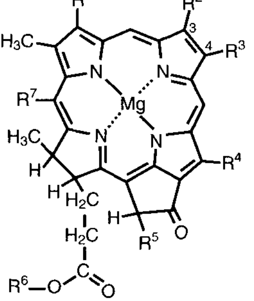


Fig. 12.10 Espectros de absorción de células intactas de bacterias fototrofas, de cianobacterias y de algas verdes. El tipo de la bacterioclorofila característica entre paréntesis. Se indica igualmente las características de absorción de los filtros infrarrojos para el enriquecimiento selectivo de bacterias rojas y verdes (**A**), de las bacterias rojas (**B**) y de las bacterias rojas que contienen clorofila b (**C**) (según Pfennig; N.: Ann. Rev. Microbiol. 21 [1967] 285).

Fig. 12.11 Relaciones entre la clorofila a y las bacterioclorofilas a, b, c, d, e y g.



Pigmento	R^1	R^2	R^3	R^4	R^5	R^6	R^7
Clorofila *a*	$-CH=CH_2$	$-CH_3$	$-CH_2-CH_3$	$-CH_3$	$O=\overset{OCH_3}{C}$	Fitol	$-H$
Bacterio-clorofila a	$O=\overset{CH_3}{C}$	$-CH_3^*$	$-CH_2-CH_3^*$	$-CH_3$	$O=\overset{OCH_3}{C}$	Fitol o geranil-geraniol	$-H$
Bacterio-clorofila b	$O=\overset{CH_3}{C}$	$-CH_3^*$	$=\underset{H}{\overset{CH_3^*}{C}}$	$-CH_3$	$O=\overset{OCH_3}{C}$	Fitol	$-H$
Bacterio-clorofila c	$-\underset{OH}{CH}-CH_3$	$-CH_3$	$-C_2H_5$ $-C_3H_7$ $-i\text{-}C_4H_9$	$-C_2H_5$ $-CH_3$	$-H$	Farnesol	$-CH_3$
Bacterio-clorofila d	$-\underset{OH}{CH}-CH_3$	$-CH_3$	$-C_2H_5$ $-C_3H_7$ $-i\text{-}C_4H_9$	$-C_2H_5$ $-CH_3$	$-H$	Farnesol	$-H$
Bacterio-clorofila e	$-\underset{OH}{CH}-CH_3$	$-CHO$	$-C_2H_5$ $-C_3H_7$ $-i\text{-}C_4H_9$	$-C_2H_5$	$-H$	Farnesol	$-CH_3$
Bacterio-clorofila g	$-CH-CH_2$	$-CH_3$	$O=\underset{H}{\overset{CH_3}{C}}$	$-CH_3$	$O=\overset{OCH_3}{C}$	Fitol	$-H$

Los **carotenoides** coloreados son de los llamados pigmentos accesorios de los organismos fototrofos. Absorben la luz en la zona del espectro de 400-550 nm. En las bacterias rojas se trata generalmente de compuestos alifáticos de 40 carbonos (tetraterpenoide) con grupos hidroxílicos o metoxílicos terciarios (licopina, rodopina, espiriloxantina, esferoidina). Mediante grupos oxo o aldehídicos pueden tomar una tonalidad rojo oscuro (esferoidenona, okenona, rodopinal). También se encuentran carotenoides con anillos aromáticos (arilcarotenoides) derivados de los γ- o β-carotenoides.

Estos carotenoides se restringen a unas pocas familias (la okenona se presenta en algunas especies de Cromatiáceas, la clorobactina es el carotenoide típico de los clorobios verdes y la isorenieratina el de los clorobios pardos).

Los carotenoides cumplen con dos misiones: por una parte son los pigmentos antena fotosintéticamente activos que transfieren la energía a la clorofila. Por otra parte tienen una función protectora; protegen a las clorofilas de los daños de una fotooxidación. Mutantes de las bacterias rojas que no disponen de carotenoides y tienen una tonalidad azul-verdosa, únicamente pueden crecer con intensidades luminosas bajas y las matan si éstas son altas.

La conclusión que puede extraerse de la variedad de curvas de absorción que presentan las algas verdes, las cianobacterias, las bacterias rojas y verdes es que los distintos grupos de organismos fototróficos pueden utilizar distintas porciones del espectro luminoso para la fotosíntesis. Estas diferencias están correlacionadas con las condiciones luminosas en cada hábitat en que se encuentran los organismos fototróficos en la naturaleza; estas diferencias se utilizan también para el cultivo selectivo de determinadas bacterias fototróficas (Fig. 12.13).

Localización de los pigmentos. Los pigmentos fotosintéticos están ligados a membranas intracitoplasmáticas en las bacterias rojas. Éstas son invaginaciones vesiculares o tubulares de la membrana citoplasmática en el interior celular y permanecen en contacto con ella. Estas membranas tienen diferentes formas según las especies y pueden presentarse como túbulos, vesículas o como paquetes de lamelas concéntricos o cilíndricos llegando incluso a ocupar todo el interior de la célula (Fig. 2.23). Se denominan también “cromatóforos” a los fragmentos de membranas que se obtienen por rotura de las células y que se liberan en forma de vesículas, pudiéndose separar mediante centrifugación. En las células de las bacterias verdes del azufre los pigmentos fotosintéticos van ligados a dos estructuras separadas: los pigmentos antena se localizan en los clorosomas y los pigmentos del centro de la reacción en las membranas citoplasmáticas (véase Fig. 2.4 y 12.9).

Regulación de la síntesis de pigmentos y de tilacoides. La síntesis de los fotopigmentos depende de las distintas condiciones de crecimiento, en primer lugar de la intensidad de iluminación y, en las formas aeróbicas facultativas, de la presencia de oxígeno. El contenido en pigmentos de las células es, bajo unas intensidades lumínicas medias, tanto mayor cuanto menor sea la intensidad de iluminación en el momento del crecimiento celular. Además de la luz, el oxígeno también influye en la síntesis de pigmentos: intensidades luminosas altas y oxígeno reprimen la formación de las estructuras membranosas portadoras de los pigmentos y con ello la síntesis de bacterioclorofilas y carotenoides. La modificación del número de los túbulos o vesículas demostrables al microscopio electrónico va paralela a las modificaciones en el contenido de pigmentos fotosintéticos. El oxígeno tiene además efectos inhibidores sobre algunas reacciones enzimáticas de la síntesis de la bacterioclorofila. El contenido mayor en fotopigmentos y en vesículas o túbulos que contienen pigmentos se encuentra en células que hayan crecido con una intensidad débil de luz y en condiciones anaeróbicas.

12.1.2 Metabolismo

El metabolismo de las bacterias fototrofas plantea una gran cantidad de problemas. Muchas de estas bacterias son polifacéticas; muchas bacterias rojas y Cloroflexáceas son capaces de desarrollarse tanto anaeróbicamente en presencia de la luz como aeróbicamente en la oscuridad; otros grupos son anaeróbicos estrictos y fototrofos obligados; muchos utilizan el hidrógeno, algunos el sulfuro de hidrógeno o el azufre como dadores de hidrógeno; el anhídrido carbónico puede ser fijado y también puede asimilarse materia orgánica; en condiciones anaeróbicas en la oscuridad puede obtenerse también alguna cantidad de energía, aunque no permite el crecimiento. Brevemente, se puede afirmar que las bacterias fototróficas representan al grupo de organismos fisiológicamente más versátil. Acerca de sus potencialidades fisiológicas podemos dar aquí únicamente algunos datos globales.

Fijación del anhídrido carbónico. Casi todas las bacterias fototróficas investigadas hasta el momento son capaces de fijar el anhídrido carbónico a través del ciclo de la ribulosabifosfato. Para la reducción del 3-fosfoglicerato se utiliza $NADH_2$ y no $NADPH_2$ como sucede en las plantas verdes. Además en la obtención del carbono intervienen también otras carboxilaciones reductivas dependientes de la ferredoxina o del NAD(P). La fijación de CO_2 permite un crecimiento totalmente autotrófico o bien se utiliza para la asimilación simultánea de compuestos orgánicos fuertemente reducidos (ácidos grasos) para mantener un equilibrio en las reacciones redox. *Chlorobium* fija CO_2 por el ciclo reductivo de los ácidos tricarboxílicos.

Dadores de hidrógeno. Las bacterias fototrofas anaeróbicas necesitan un dador externo de hidrógenos. Pueden utilizar hidrógeno molecular, sulfuro de hidrógeno, azufre elemental, tiosulfato, ácidos orgánicos, alcoholes, azúcar o incluso algunos compuestos aromáticos. El hidrógeno es utilizado por muchas de ellas, pero no por todas las bacterias fototróficas. Los cromatios pequeños, especies de *Rhodobacter* (p. ej. *R. capsulatus*), los rodospirilos y los clorobios pueden crecer con H_2 y CO_2 en la luz. El rendimiento cuántico es en este caso casi tan alto como en la fotosíntesis oxigénica. Tanto en *Rhodopseudomonas acidophila* como en la cianobacteria *Anabaena cylindrica* supone 8 moles (EINSTEIN) cuantos por mol de anhídrido carbónico fijado.

Algunas bacterias rojas sin azufre, las rojas del azufre y las bacterias verdes del azufre pueden oxidar el sulfuro de hidrógeno a sulfato. En esta oxidación la mayoría de las bacterias rojas del azufre acumulan intracelularmente azufre como intermediario y de forma transitoria. La capacidad de poder oxidar rápidamente sulfuro de hidrógeno con la luz y de acumular azufre se debe a que en los hábitats naturales, charcas y lagunas, los grandes cromatios predominan cuantitativamente; el azufre intracelular actúa entonces como un almacén de poder reductor y permite la asimilación de CO_2 con la luz, incluso sin necesidad de un dador externo de hidrógeno. En la utilización del tiosulfato puede hacerse una distinción entre el azufre sulfánico y el sulfónico; únicamente se almacena el sulfánico; el azufre sulfónico aparece inmediatamente como sulfato en el medio. Algunos clorobios oxidan el sulfuro de hidrógeno únicamente hasta azufre, que es liberado al exterior. Estas bacterias se desarrollan de una forma especialmente abundante cuando están asociadas con *Desulfuromonas acetoxidans*; esta bacteria, de "respiración anaeróbica" reduce el azufre a sulfuro de hidrógeno y oxida el etanol a acetato. Las bacterias *Chlorobium* y *Desulfuromonas* ofrecen un ejemplo modelo de una asociación funcional, la sintrofía de dos microorganismos (pág. 350).

Metabolismo en la oscuridad. Muchas bacterias rojas sin azufre y *Chloroflexus* son capaces de crecer aeróbicamente en la oscuridad cuando tienen a su disposición un sustrato orgánico. Esto permite reconocer que disponen de los componentes del metabolismo respiratorio, incluyendo el ciclo de los ácidos tricarboxílicos. Este último también participa en condiciones anaeróbicas en la luz en las transformaciones de los sustratos. La utilización de un gran número de ácidos orgánicos y azúcar por algunas Cromatiáceas y Rodospiriláceas permite concluir que el metabolismo básico de las bacterias fototróficas puede variar, pero que en un principio sigue las vías conocidas (vía de la fructosabifosfato, vía de ENTNER-DOUDOROFF, ciclo de los ácidos tricarboxílicos, etc.).

En condiciones anaeróbicas en la oscuridad también es posible una modesta ganancia de energía, lo cual no debe asombrarnos ya que las bacterias fototrofas deben también sobrevivir por la noche. Puede darse una fermentación con materiales de reserva como dadores de hidrógenos y si existe, con azufre como aceptor de hidrógenos. Como productos finales del metabolismo anaeróbico en la oscuridad se ha demostrado la formación de anhídrido carbónico, acetato, propionato y sulfuro de hidrógeno.

No obstante, en condiciones anaeróbicas en la oscuridad no tiene lugar ningún crecimiento.

Fotoproducción de hidrógeno. En presencia de dadores orgánicos o inorgánicos de hidrógeno apropiados algunos representantes de las bacterias rojas y de las Clorobiáceas son capaces de producir hidrógeno molecular en presencia de la luz. La formación de H_2 depende de la relación C/N del sustrato en el medio, y es reprimida por los iones de amonio libres. También es inhibida reversiblemente por el N_2. La fotoproducción de H_2 se debe a una función colateral de la *nitrogenasa*, que además del N_2 puede reducir protones y por tanto liberar H_2; bajo un exceso de energía y de poder reductor tiene lugar una evolución de H_2.

Fijación del nitrógeno. La gran mayoría de las bacterias fototróficas comprobadas hasta el momento son capaces de fijar el N_2. La tasa de crecimiento es, no obstante, bastante inferior que en presencia de iones amonio.

Materiales de reserva. En las bacterias fototróficas aparecen los materiales de reserva típicos: poli-β-hidroxibutirato, polisacáridos y polifosfatos. Según las condiciones de crecimiento las Cromatiáceas pueden tener inclusiones de azufre, incluidas en vacuolas como azufre ortorrómbico.

12.1.3 Distribución de las bacterias fototróficas

Distribución. Las bacterias fototrofas se encuentran en las zonas anaeróbicas de muchos hábitats acuáticos, en charcas poco profundas, en corrientes lentas, en lagos y en bahías marinas. Las bacterias rojas del azufre recubren frecuentemente los limos y el material vegetal en descomposición dándole una tonalidad asalmonada hasta rojo oscuro; normalmente flotan en capas de varios decímetros de espesor por encima del horizonte de los limos. A estas floraciones en lagunas (Fig. 12.12) llegan sobre todo los grandes representantes de las Cromatiáceas, *Chromatium okenii*, *C. warmingii*, *C. weissei* y *Thiospirillum jenense*, pero también algunos cromatios pequeños y Clorobiáceas. Las bacterias rojas del azufre pueden también tener un desarrollo masivo en las lagunas poco profundas cuando la superficie del agua está totalmente cubierta por las lentejas del agua (*Lemna*) o por nenúfares. Estos filtros biológicos absorben la fracción del espectro utilizable por las algas verdes y las cianobacterias, pero dejan pasar la luz asimilable por las bacterioclorofilas y por los carotenoides de coloración rojo oscura. Como consecuencia, bajo las cubiertas de *Lemna* pueden crecer las bacterias anaeróbicas fototróficas, pero ninguna alga verde ni cianobacteria (Fig. 12.12). Algunas especies pueden presentarse casi como cultivos puros en estos hábitats. Las Rodospiriláceas siempre están presentes, pero únicamente aparecen de forma masiva en raras ocasiones.

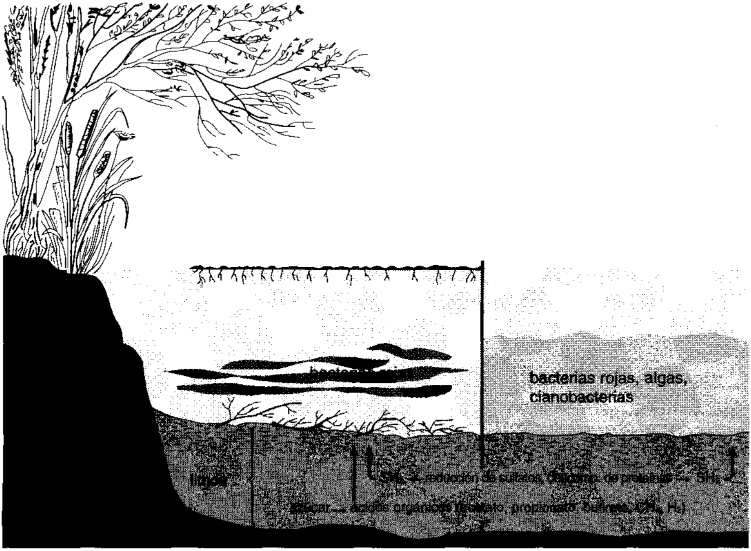

bacterias rojas, algas,
cianobacterias
reducción de sulfatos, descomp. de proteínas
ácidos orgánicos (acetato, propionato, butirato, CH_4, H_2)

Fig. 12.12 Margen de unas aguas poco profundas en las que las bacterias rojas del azufre se desarrollan masivamente.

En las zonas anaeróbicas de los lagos por debajo de la termoclina (quimioclina, Fig. 17.2) se da también un crecimiento estacional masivo de las bacterias rojas del azufre. Allí disponen de sulfuro de hidrógeno, anhídrido carbónico y materia orgánica. La zona infrarroja del espectro de luz solar no llega por debajo de unos 10 a 30 metros. A esta profundidad se encuentra el máximo de la distribución de energía del espectro en las zonas azul y verde-azul, de 450 hasta 500 nm, justo aquella zona que es absorbida por los carotenoides. El contenido en carotenoides relativamente alto, que determina el color de las bacterias rojas, resulta entonces comprensible: los carotenoides (como por ejemplo la ficoeritrina de las algas rojas y algunas cianobacterias) son los que permiten que las bacterias rojas tengan un fotometabolismo a mayores profundidades. Como consecuencia de todo ello, en estas profundidades predominan también entre las bacterias verdes del azufre aquellas que son ricas en carotenos, de coloración pardusca (*Chlorobium phaeobacteroides*, *C. phaeovibriodes*, *Pelochromatium*).

Cultivo de enriquecimiento. El enriquecimiento en las bacterias fototrofas anaeróbicas se basa en la observación de que las bacterias rojas del azufre tienen desarrollos masivos en las lagunas poco profundas bajo las cubiertas de *Lemna*. Mediante filtros que absorban las zonas de longitud de onda corta y permitan únicamente el paso de la luz infrarroja correspondiente a cada uno de los grupos, pueden establecerse condiciones de crecimiento selectivas, tanto para las bacterias rojas del azufre como para las bacterias rojas que dispongan de bcl a o bcl b.

Además, el dador de hidrógenos tiene un papel decisivo lo mismo que la concentración en sulfuro de hidrógeno para permitir el enriquecimiento en Rodospiriláceas, Cromatiáceas o Clorobiáceas ("columna de Winogradsky", o sulfuretum, Fig. 12.13). Si se rellena una probeta con proteína, tierra, arena y agua, y se inocula con material apropiado, en la luz se desarrollarán las Rodospiriláceas. Si se añade sulfato de calcio se asegurará que por reducción del sulfato se vaya produciendo constantemente sulfuro de hidrógeno; así se reprime el crecimiento de las bacterias rojas sin azufre y predominan las bacterias del azufre. Con medios de cultivo sintéticos que contengan vitamina B_{12} pueden establecerse gradaciones más finas en cuanto a las concentraciones de sulfuro de hidrógeno y de sales

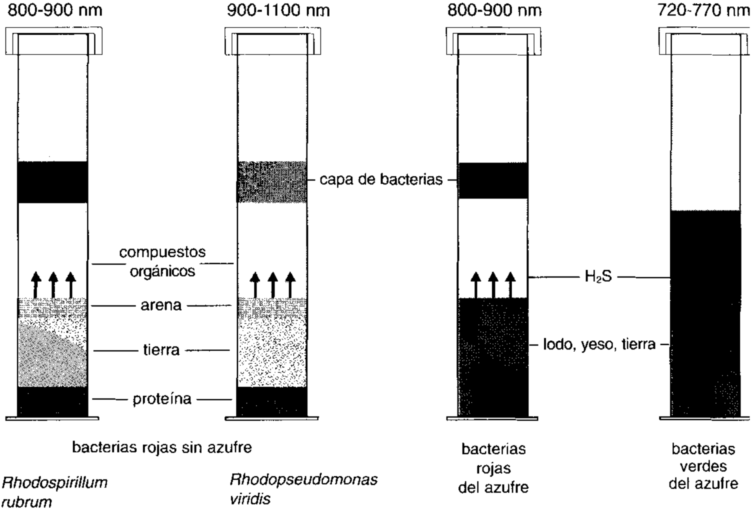

800-900 nm
900-1100 nm
800-900 nm
720-770 nm
capa de bacterias
compuestos orgánicos
arena
tierra
proteína
H₂S
lodo, yeso, tierra
bacterias rojas sin azufre
Rhodospirillum rubrum
Rhodopseudomonas viridis
bacterias rojas del azufre
bacterias verdes del azufre

Fig. 12.13 Cultivos de enriquecimiento ("columnas de Winogradsky") para bacterias fototrofas. En la parte superior se dan los límites de los filtros luminosos con los que se produce un desarrollo preferente de las especies y grupos de bacterias mencionados. Transcurridos unos días, tras preparar el cultivo e inocularlo con barro y agua de un estanque, se forman "capas de bacterias" rojas o verdes en las columnas de agua.

nutritivas, del valor del pH, de la temperatura y de la intensidad luminosa, de modo que pueden enriquecerse las distintas especies de las bacterias verdes y las bacterias rojas. Formas especialmente sensibles, como las formadoras de vacuolas gaseosas, por ejemplo, requieren concentraciones bajas de sulfuro de hidrógeno, temperaturas e intensidades luminosas bajas. En el enriquecimiento de determinadas bacterias rojas sin azufre tienen un papel decisivo el dador de hidrógenos y la presencia de algunas vitaminas (biotina, ácido 4-aminobenzoico, tiamina, ácido nicotínico).

12.2 Los procesos elementales de la fotosíntesis

Por fotosíntesis se entiende la **transformación de la energía luminosa** en energía bioquímicamente utilizable (**ATP**) y **poder reductor** ($NAD(P)H_2$) en las células de los organismos fototróficos, así como la síntesis de los componentes celulares correspondientes. La fosforilación fotosintética y la reducción fotosintética de los nucleótidos de piridina son los procesos elementales de la fotosíntesis.

Se llegó a esta conclusión mediante una serie de experimentos y estudios basados fundamentalmente en la comparación de la fotosíntesis en las bacterias fototrofas con la fotosíntesis que se lleva a cabo en las plantas verdes. Una vez WINOGRADSKY (1888) comprobó que en las bacterias del azufre la asimilación del CO_2 no siempre se hallaba ligada a la luz como única fuente de energía y ENGELMANN (1883-1888) basándose en estudios de excitación fisiológica describió las bacterias purpúreas como organismos fototrofos. BUDER (1919) estableció que las bacterias purpúreas eran miembros de un nuevo tipo de metabolismo: las bacterias rojas del azufre y las purpúreas que no son del azufre asimilan anhídrido carbónico o bien productos orgánicos en presencia de luz. Este tipo de fotosíntesis se diferencia sin embargo básicamente del de las plantas superiores: a) en que no se produce liberación de O_2 por no poder usar H_2 como dador de hidrógeno, y b) en la utilización de ácido sulfhídrico o de materia orgánica. Los estudios cuantitativos realizados con las bacterias rojas del azufre (VAN NIEL, 1931) permitieron establecer la ecuación de asimilación:

$$CO_2 + 2\,H_2S \xrightarrow{h\upsilon} \langle CH_2O\rangle + H_2O + 2\,S$$

$$2\,CO_2 + H_2S + 2\,H_2O \xrightarrow{h\upsilon} 2\,\langle CH_2O\rangle + H_2SO_4$$

Si se compara la primera ecuación con la de la fotosíntesis en las plantas verdes se obtiene la sorprendente analogía:

Chromatium:

$$CO_2 + 2\,H_2S \xrightarrow{h\upsilon} \langle CH_2O\rangle + H_2O + 2\,S$$

Plantas verdes:

$$CO_2 + 2\,H_2O \xrightarrow{h\upsilon} \langle CH_2O\rangle + H_2O + 2\,O$$

Puede pues concluirse que el ácido sulfhídrico realiza en la fotosíntesis bacteriana el papel del agua en las plantas verdes. La ecuación general de la fotosíntesis

$$CO_2 + 2\ H_2A \xrightarrow{h\nu} \langle CH_2O\rangle + H_2O + 2\ A$$

que puede obtenerse permitió emitir la hipótesis de que la base de esas fotosíntesis está constituida por el mismo proceso elemental y que los distintos tipos sólo se diferencian por la naturaleza del dador de hidrógeno (agua, ácido sulfhídrico o materia orgánica). Se consideró que el proceso elemental común consistía en una hidrólisis del agua ($H_2O\ h\nu \rightarrow [H] + [OH]$) en un componente reductor y en un componente oxidante. Mientras que las bacterias dependen de un dador externo de hidrógenos H_2A que les permitirá reducir el componente oxidante a agua, las plantas verdes han adquirido la capacidad de liberar oxígeno a partir de dicho componente oxidante ($4\ [OH] \rightarrow 2\ H_2O + O_2$). Incluso si se tuviese que prescindir de la concepción de la hidrólisis del agua como proceso elemental primario de la fotosíntesis continuaría conservándose el principio de un transporte de equivalentes de reducción provocado por la luz en el concepto moderno de la teoría del flujo de electrones de la fotosíntesis.

Los **productos de la fotosíntesis** son el ATP y el poder reductor. Estos productos pueden demostrarse tanto en células intactas como en los cloroplastos aislados (de las plantas verdes), y en las suspensiones de las vesículas membranosas fotosintéticas de las bacterias rojas. La fijación del CO_2 no va acoplada ineludiblemente a las reacciones luminosas, sino que puede transcurrir como "reacción oscura" independientemente de las estructuras que soportan los pigmentos, cuando haya suficiente ATP y $NAD(P)H_2$. Estos dos procesos también están separados espacialmente: la fotosíntesis tiene lugar en las membranas, la fijación del CO_2 en el citoplasma o en el estroma de los cloroplastos. Tal como se ha indicado anteriormente, se distingue una fotosíntesis oxigénica en las cianobacterias y en las plantas, y por otra parte, una fotosíntesis anoxigénica en las bacterias anaeróbicas fototrofas debido a los dadores de hidrógeno utilizados. Para la utilización del agua como dador de hidrógenos son necesarios dos fotorreacciones sucesivas. Para la utilización de dadores de hidrógenos con un potencial redox más negativo que el agua es suficiente una sola fotorreacción.

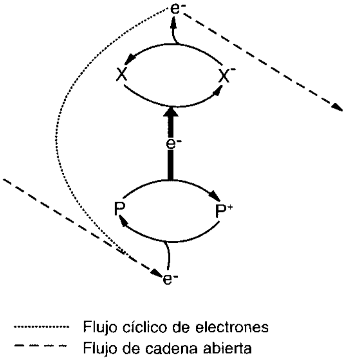
Las fotorreacciones. El proceso elemental primario de la fotosíntesis son las fotorreacciones. Estas reacciones redox fotoquímicas tienen lugar en los centros fotoquímicos de reacción. El centro de reacción está compuesto por varios componentes, siendo los más importantes el dador primario de electrones, un complejo especial clorofila-proteína, y el aceptor primario de electrones, denominado "X". En ambos casos se trata de sistemas redox. El sistema dador (P/P^+) tiene siempre un potencial positivo, el sistema aceptor (X/X^-) negativo. La excitación energética conduce a la transferencia de un electrón:

$$\text{dador}_{red} + \text{aceptor}_{ox} \xrightarrow{h\upsilon} \text{dador}_{ox} + \text{aceptor}_{red}$$

También puede escribirse:

$$P + X \xrightarrow{h\upsilon} P^+ + X^-$$

Por tanto, en la fotorreacción tiene lugar la pérdida de un electrón en el dador. Esta falta tiene que quedar cubierta por otros electrones. Según el origen de estos electrones hemos de distinguir entre un **flujo cíclico de electrones** y otro de **cadena abierta**. En este último los electrones proceden de un dador externo: en el caso de la segunda fotorreacción a partir del agua, en el de la primera reacción a partir de la cadena transportadora de electrones que une los dos fotosistemas. En el flujo cíclico de electrones pasan de un aceptor reducido (X^-) hasta un dador oxidado. La reacción redox fotoquímica, en la que se oxida el P y se reduce el X, está representada en el esquema adjunto.



Mientras que el flujo de electrones de cadena abierta determina tanto una reducción del NADP como un desplazamiento de carga en la membrana, en el flujo cíclico de electrones tiene lugar únicamente un desplazamiento de cargas

12.2.1 Fotosíntesis anoxigénica

En el sistema de transporte de electrones fotosintético de las bacterias fototrofas participa únicamente una sola reacción luminosa. Ésta impulsa un transporte cíclico de electrones. Los electrones que salen del ciclo para reducir el NAD no pueden obtenerse por la escisión del agua. La fotosíntesis depende de la presencia en el medio de sustratos reducidos, y no se libera oxígeno. La verdadera reacción luminosa es análoga a la primera reacción luminosa de las plantas verdes, pero tiene como consecuencia probablemente tan sólo la determinación de un potencial de protones y por tanto de energía (ATP) pero no la reducción del NAD. Falta por tanto un "transporte de electrones en cadena abierta" (desde el dador de electrones hasta el nucleótido de piridina). Aparentemente el $NADH_2$ se forma en el curso de una reacción oscura mediante un transporte inverso de electrones que requiere un consumo de energía. Por lo demás, entre las distintas bacterias fototróficas se dan unas diferencias mayores entre los distintos grupos en cuanto a la composición de pigmentos y a los mecanismos fotosintéticos que entre las plantas verdes. En la siguiente exposición global deben dejar de considerarse por el momento a las bacterias verdes.

Fotorreacción en las bacterias rojas. Los pigmentos y los componentes del transporte de electrones están localizados en membranas. El complejo de pigmentos del centro de reacción fotoquímico puede separarse de los pigmentos antena. La energía absorbida por los pigmentos antena (bacterioclorofilas y carotenoides) es conducida a los centros de reacción (CR). Los centros de reacción aislados están compuestos por un complejo proteico, la bcl a, la bacteriofeofitina, carotenoides, ubiquinona y una proteína sulfoférrica. Debido a la longitud de onda que determina la máxima disminución en la absorción durante la iluminación el pigmento del centro de reacción se denomina P870.

El CR de *Rhodopseudomonas viridis* se pudo aislar y cristalizar. Se ha elucidado la situación de los grupos prostéticos en el interior de la estructura determinada por la cadena polipéptidica del CR mediante análisis estructural por rayos X. Una vez conseguido con éxito el análisis estruc-

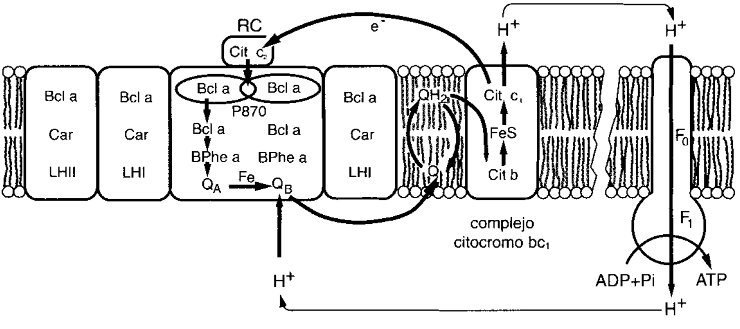


Fig 12.14 Representación esquemática de una membrana fotosintética de bacterias rojas con el transporte cíclico de electrones. Abreviaturas: LH I = complejo I de pigmentos antena (B870); LH II = complejo II de pigmentos antena (B800-850); Bcl a = bacterioclorofila a; BPhe a = bacteriofeofitina a; Q_A = quinona A; Q_B = quinona B; Q = "pool" de quinonas; P870 = pigmento 870 = (par especial de la Bcl a); RC = centro de reacción; Car = carotenoide; Cit b = citocromo b; Cit c_1 = citocromo c_1; FeS = centro sulfoférrico (proteína de Rieske); Cit c_2 = citocromo c_2; F_0 = componente F_0 de la *ATP-sintasa*; F_1 = componente F_1 de la *ATP-sintasa* ; Cit bc_1 = complejo citocromo bc_1.

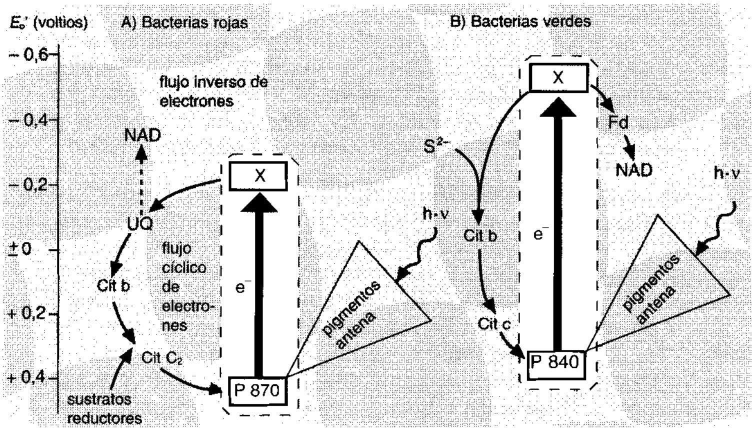

E_0' (voltios)
A) Bacterias rojas
B) Bacterias verdes
−0,6
−0,4
−0,2
±0
+0,2
+0,4
flujo inverso de electrones
NAD
UQ
Cit b
flujo cíclico de electrones
Cit C_2
sustratos reductores
X
e⁻
P 870
h·v
pigmentos antena
S²⁻
Cit b
Cit c
X
e⁻
P 840
Fd
NAD
h·v
pigmentos antena

Fig. 12.15 Esquema del transporte fotosintético de electrones en las Rodospiriláceas y las Clorobiáceas en un diagrama de potenciales redox. Abreviaturas: Cit = citocromo; Fd = Ferredoxina; UQ = ubiquinona; P870 o P840 = Bcl a = dador de electrones del centro de reacción (CR); X = aceptor de electrones del CR. El centro de reacción fotoquímico se ha enmarcado en rojo.

tural por rayos X del CR de *R. viridis* que dispone de bcl b, se extendieron los análisis a *Rhodobacter sphaeroides*, cuyo pigmento fotosíntetico es bcl a. El flujo de electrones en el CR, que se estudia a continuación (Fig. 12.14) se refiere al CR con bcl a de *R. sphaeroides*. En el interior del CR actúa un par de dadores de electrones primarios, el llamado "par especial" en la bacterioclorofila a (en el esquema abreviado como P870). De ahí se transfiere el electrón a una sola bcl a, a continuación se transfiere a la bacteriofeofitina (BPhe a, una bacterioclorofila a sin magnesio) y por último a la ubiquinona. La ubiquinona está tan próxima a la BPhe a que la cadena lateral isoprenoide casi toca a la BPhe a. En las proximidades de la ubiquinona hay un centro sulfoférrico. Los electones de la quinona pasan a otras quinonas de difusión libre (quinona almacén).

Los electrones vuelven al "par especial" P 870 desde la ubiquinona a través del complejo cit bc_1 y cit c_2 (Fig. 12.14 y 12.15). Hay que pensar que los electrones necesarios para la reducción del NAD salen del flujo cíclico de electrones y se transfieren hasta el NAD a través de un transporte inverso de electrones que consume ATP. Para suministrar electrones al ciclo las bacterias rojas necesitan unos dadores externos de electrones: o bien sulfuro de hidrógeno, azufre o tiosulfato en las bacterias rojas del azufre; compuestos orgánicos (malato, succinato, entre otros) o hidrógeno en los dos grupos de las bacterias rojas.

Se ha demostrado experimentalmente en bastantes ocasiones que el transporte fotosintético de electrones determina también en las bacterias rojas un gradiente de protones. Las células intactas reaccionan frente a la iluminación con una extrusión de protones (acidificación del medio). En las suspensiones de vesículas membranosas fotosintéticas (cromatóforos) tiene lugar durante la iluminación un transporte de protones hacia el interior de las vesículas. La polaridad de las membranas vesiculares y de los tilacoides es por tanto la misma que en las vesículas submitocondriales; la polaridad puede comprenderse cuando uno se imagina que las membranas se originan por invaginaciones de la membrana citoplasmática o de las membranas internas de los cloroplastos (Fig. 12.18). En las vesículas se transportan los electrones hacia fuera y los protones hacia dentro.

Fotorreacción de las Clorobiáceas. Aún no está totalmente aclarada la fotorreacción en las bacterias verdes. Existen datos de que el aceptor primario de electrones en la reacción luminosa tiene un potencial de aproximadamente – 500 mV (frente a los – 100 mV de las bacterias rojas). Con un potencial tan negativo los electrones pueden utilizarse directamente desde el aceptor primario para reducir la ferredoxina y los nucleótidos de piridina (Fig. 12.15). Probablemente las Clorobiáceas no necesiten un transporte de electrones inverso, que requiere energía, para la obtención de poder reductor. Esta independencia en cuanto a un transporte inverso de electrones representaría una diferencia esencial con respecto a la fotosíntesis de las bacterias rojas. El rendimiento de la fotorreacción en las Clorobiáceas correspondería totalmente al de la primera fotorreacción de las cianobacterias. Bajo el aspecto de la evolución de la fotosíntesis la de las Clorobiáceas vendría a representar el eslabón que une la fotosíntesis de las bacterias rojas con la de las cianobacterias y las plantas.

12.2.2 Fotosíntesis oxigénica

Los procesos elementales de la fotosíntesis se desarrollan en los tilacoides. Los tilacoides son vesículas membranosas aplanadas y cerradas. Están contenidas en las células de las cianobacterias y en los cloroplastos de las algas y las plantas.

Membranas de tilacoides y pigmentos antena. La membrana de los tilacoides contiene las moléculas pigmentadas clorofila a, clorofila b y carotenoides, así como transportadores electrónicos y enzimas. La mayor parte de las moléculas de clorofila (> 99,5%) así como de los pigmentos accesorios (carotenoides, ficobiliproteínas) se utilizan en la absorción de la luz y en la transmisión de energía; constituyen el **sistema pigmentario antena**. Sólo una pequeña porción de la clorofila a actúa como centro fotoquímico de reacción. En él se da la verdadera reacción redox fotoquímica.

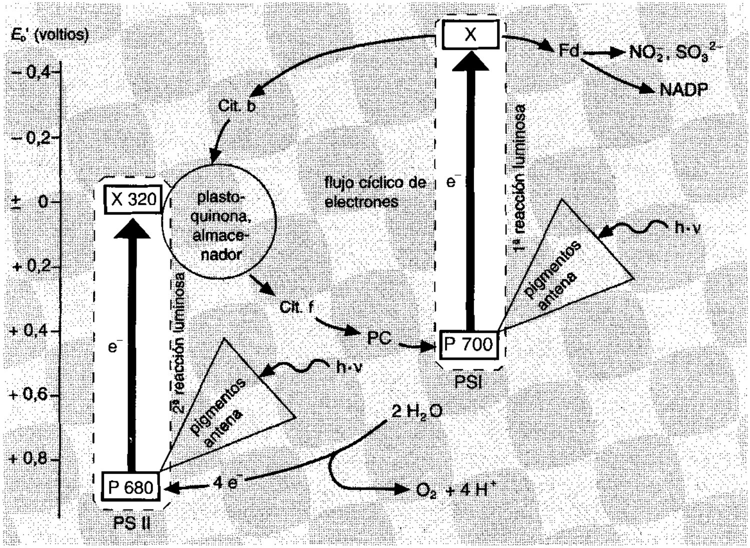

E_0' (voltios)
−0,4
−0,2
± 0
+0,2
+0,4
+0,6
+0,8
X
Fd
NO_2^-, SO_3^{2-}
NADP
Cit. b
X 320
plasto-quinona, almace-nador
flujo cíclico de electrones
e^-
1ª reacción luminosa
pigmentos antena
h·v
Cit. f
PC
P 700
PSI
2ª reacción luminosa
e^-
pigmentos antena
h·v
2 H_2O
P 680
4 e^-
O_2 + 4 H^+
PS II

Fig. 12.16 Esquema en zig-zag del transporte fotosintético de electrones en un diagrama de potenciales redox. Abreviaturas: P700 = cl a_I, dador de electrones del sistema pigmentario o fotosistema (PS) I; P680 = cl a_{II}, dador de electrones del sistema pigmentario o fotosistema II; X 320 = aceptor de electrones del PS II; X = aceptor de electrones del PS I, una proteína sulfoférrica; Fd = ferredoxina; PC = plastocianina; Cit = citocromo. Los centros fotoquímicos de reacción están en rojo.

Los pigmentos antena captan la luz y transfieren la energía al centro de reacción clorofílico (Car → Car*; Cl + Car* → Cl* + Car). Los carotenoides tienen también una función protectora: el exceso de energía con luz solar intensa es transferido al entorno y así protegen a las clorofilas de fotooxidaciones destructoras.

Dos fotorreacciones en dos sistemas pigmentarios. En la fotosíntesis oxigénica se suceden dos sistemas pigmentarios (Fig. 12.16). El sistema pigmentario excitable por longitudes de onda larga ($\lambda < 730$ nm) se denomina sistema I y el excitable por longitudes de onda corta ($\lambda < 700$ nm) se denomina sistema II. El centro fotoquímico de reacción activo del sistema I contiene cl a_I (= P700); actúa como el dador primario de electrones de la primera fotorreacción. La radiación incidente absorbida por los pigmentos antena del sistema I y la energía transferida a los centros de reacción excitan a la cl a_I. Esta excitación conduce a la oxidación de la cl a_I, esto es, a la emisión de un electrón. La cl a_I pasa entonces a cl a_I^+. El aceptor del electrón emitido por la cl a_I es probablemente una proteína sulfoférrica (“X”).

Éste tiene un potencial redox aún más negativo que – 420 mV, posiblemente de – 530 mV. Este aceptor transfiere el electrón a la ferredoxina y la Fd_{red} puede transferir a continuación el poder reductor al NADP o a otros aceptores. De forma alternativa el electrón de "X" puede pasar a través de la plastoquinona, citocromos y plastocianina en un flujo cíclico de electrones hasta la clorofila a_I^+ del centro de reacción y rellenar el defecto en el electrón.

El centro de reacción del sistema II contiene cl a_{II} (= P680); éste es el dador primario de electrones de la segunda fotorreacción. Es excitado por la energía absorbida por los pigmentos antena del sistema II. La excitación de la cl a_{II} conduce a la emisión de un electrón; éste es captado por una molécula especial de plastoquinona (X 320), que es reducida a continuación por la semiquinona. El electrón así captado es débilmente reductor (E_0'~ 0 V). El dador de electrones para el sistema de pigmentos II es el agua. El defecto en electrones localizado en la cl a_{II}^+ viene suplido por un electrón resultado de la liberación de O_2 a partir del H_2O ($2\ H_2O \rightarrow O_2 + 4\ H^+ + 4\ e^-$). En esta escisión del agua participa el manganeso.

Los dos sistemas de pigmentos están unidos entre sí por una cadena transportadora de electrones y cooperan en serie. El eslabón esencial es la plastoquinona. Al igual que la ubiquinona en la cadena respiratoria, la plastoquinona en la cadena transportadora de electrones de la fotosíntesis se encuentra en exceso y actúa como un almacenador de electrones. Este reservorio tiene como mínimo una capacidad de 10 electrones (por cl a_{II}). El reservorio capta los electrones del X 320. La oxidación de este almacenador tiene lugar a través del fotosistema I; los electrones de la plastoquinona se utilizan para rellenar el defecto en electrones de la cl a_I^+. Los electrones son conducidos desde el reservorio a través del citocromo f (un citocromo del tipo c ligado a membranas) y la plastocianina (una proteína soluble que contiene cobre) y actúan como transportadores redox hasta la cl a_I^+. La plastoquinona tiene una importante función como recolector y transmisor de electrones en varias cadenas; un mismo reservorio puede actuar conjuntamente para 10 cadenas transportadoras de electrones.

Las vías principales de transporte de electrones en el proceso fotosintético primario están representadas en un diagrama energético (Fig. 12.16). Este conocido esquema en zig-zag del flujo de electrones es el resultado de investigaciones con los métodos de la espectrofotometría por destellos, así como de inhibidores específicos. Indica los potenciales redox de los pigmentos y de los transportadores de electrones, así como la sucesión temporal de sus oxidaciones y reducciones, pero no dice nada acerca de la localización de estos componentes en la membrana.

Localización de los pigmentos y transportadores electrónicos en la membrana. Se consiguieron indicaciones acerca de la localización de los sistemas pigmentarios y de los transportadores de electrones comproban-

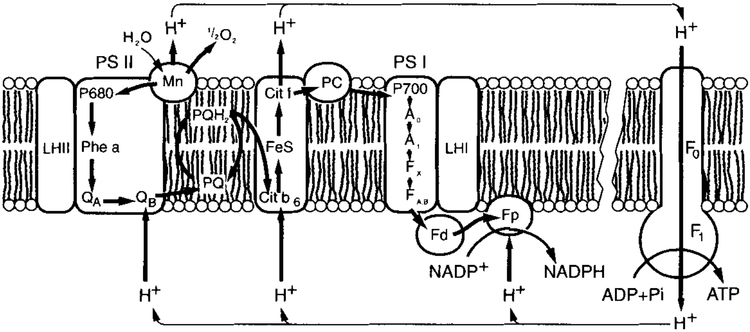


Fig. 12.17 Representación esquemática de una membrana fotosintética de una planta verde con los dos fotosistemas PS I y PS II. Los componentes están ordenados de tal manera en la membrana del tilacoide que se crea un flujo vectorial de electrones (e^-) a través de la membrana. Abreviaturas: A_0, receptor primario (clorofila) del PS I; A_1, receptor secundario (filoquinona) del PS I; Cit b_6, citocromo b_6; Cit f, citocromo f; F_1, componente F_1 de la *ATP-sintasa*; $F_{A,B}$, centros sulfoférricos A y B; Fd, ferredoxina; FeS, centro sulfoférrico; F_0, componente F_0 de la *ATP-sintasa*; Fp, flavoproteína (*ferredoxina-NADP-óxido-reductasa*); F_X, centro sulfoférrico X; LH I, complejo I de pigmentos antena; LH II, complejo II de pigmentos antena; Mn, complejo de manganeso de hidrólisis; P680, pigmento 680 (clorofila a, par especial); P700, pigmento 700 (clorofila a, par especial); PC, plastocianina; Phe a, feofitina (aceptor primario del PS II); PQ, plastoquinona; Q_A, aceptor secundario (quinona A) del PS II; Q_B, quinona B.

do la función de los tilacoides en presencia de anticuerpos o de sistemas redox lipófilos o hidrófilos artificiales (Fig. 12.17). Los anticuerpos obtenidos contra componentes aislados del sistema transportador de electrones fotosintético no pueden atravesar la membrana y reaccionan únicamente con los componentes localizados en la cara externa del tilacoide. Por ejemplo, anticuerpos contra la ferredoxina o *ferredoxina-NADP-reductasa* reaccionan perfectamente e inhiben al fotosistema I; por tanto, estos componentes se sitúan en la cara externa del tilacoide. El dador de electrones se encuentra en la cara interna.

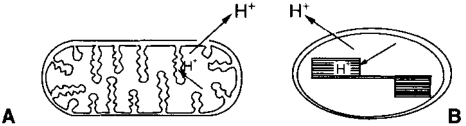


Fig. 12.18 Transporte de protones en células y orgánulos iluminados. A *Rhodobacter sphaeroides*, **B** Cloroplastos. Aclaraciones en el texto.

Transporte vectorial de electrones y establecimiento de un gradiente de protones. La localización de los componentes del flujo fotosintético de electrones está de acuerdo con las medidas y las observaciones fisiológicas. Si se ilumina una suspensión de cloroplastos rotos o de tilacoides, el valor del pH en el medio externo aumenta; al cesar la iluminación vuelve a bajar. La luz conduce a un transporte de protones hacia el interior de los tilacoides (Fig. 12.17 y 12.18). Puede utilizarse por tanto la energía luminosa para establecer un gradiente de protones en la membrana de los tilacoides. También se discutió al principio que en suspensiones de tilacoides en la oscuridad puede darse una síntesis de ATP, cuando el valor del pH en el medio asciende de 4 a 8. Estas experiencias pertenecen a las primeras que apoyaron la hipótesis quimiosmótica de la transformación de la energía. Experiencias más profundas dieron como resultado que en el transporte de un electrón en las dos reacciones luminosas se transportan dos protones en el espacio interno de los tilacoides. Se acepta que las dos fotorreacciones, conjuntamente con la cadena transportadora de electrones, determinan el flujo vectorial desde el agua (en la cara interna de la membrana) hasta el NADP (cara externa de la membrana). Las fotorreacciones conducen así a una reducción del NADP y a una carga de la membrana. Expresado de otro modo: las reacciones luminosas determinan una bomba de protones; el potencial de protones se acopla por tanto a un transporte fotosintético de electrones con una fosforilación, del mismo modo que en la cadena respiratoria el transporte de electrones se acopla a una fosforilación (véase pág. 268 y siguientes).

12.2.3 Resumen de los procesos elementales de la fotosíntesis

La fotosíntesis transforma la luz en energía bioquímica. La acción primaria de la luz consiste en transferir electrones de los centros de reacción fotoquímicos desde un dador hasta un aceptor en contra de un gradiente termodinámico. Por lo menos una parte de estos electrones vuelve a través de una cadena de transporte de electrones hasta el centro de reacción. A través de una ordenación apropiada de los componentes de la cadena de transporte de electrones en la membrana se establece un transporte y un potencial de protones. Por tanto, el aparato fotosintético es en primer lugar una “bomba de protones impulsada por la luz”. El potencial de protones es la premisa para que pueda darse una transformación energética por fosforilación. Esta regeneración de ATP discurre a través de un mecanismo semejante al de las membranas de las bacterias que respiran y de las mitocondrias. En cuanto a la transformación de la energía luminosa en energía bioquímicamente útil (ATP), no existen diferencias importantes entre la fotosíntesis de las bacterias fototrofas y la de las bacterias verdes: en las bacterias rojas la fotosíntesis se agota aparentemente en esta ganancia de energía. En la fotosíntesis de las cianobacterias y las plantas verdes puede verse una fotosíntesis más evolucionada. Mediante la sucesión de dos reacciones luminosas ha sido posible elevar los electrones en la primera reacción luminosa hasta tal punto que puedan reducir a la ferredoxina y al NADP. Una segunda reacción luminosa permite la utilización del agua como fuente de electrones. Esta combinación ha tenido como consecuencia la ganancia adicional de energía y una reducción del NADP con la liberación de oxígeno.

El proceso fotosintético es la reacción química que se realiza con mayor frecuencia sobre la Tierra. A ella debemos tanto la síntesis continua de nueva materia orgánica como las fuentes energéticas fósiles, carbón, petróleo y gas natural. Resulta por tanto justificado todo el empeño que se ha realizado para descifrar los misterios de la fotosíntesis. No obstante, quedan aún muchos problemas por resolver. Junto a los hechos demostrados experimentalmente se han incluido en el modelo de la fotosíntesis anteriormente presentado muchas hipótesis cuya demostración no requiere menos esfuerzos.

12.3 Utilización de la energía luminosa por las halobacterias

Las especies del género *Halobacterium* (*H. halobium*, *H. cutirubrum*) constituyen un grupo bacteriano fisiológicamente muy especializado. Sus hábitats son disoluciones salinas muy concentradas o saturadas, como el mar Muerto, los grandes lagos salados de Utah o las salinas en las que se obtiene sal marina por evaporación. Las bacterias están adaptadas a estos hábitats extremos de forma que la concentración salina en el interior de la célula es tan alta como en el entorno. Crecen óptimamente en disoluciones de NaCl 3,5 a 5,0 molar. Las proteínas enzimáticas aisladas de las células requieren también para su funcionamiento concentraciones salinas superiores a 2 molar.

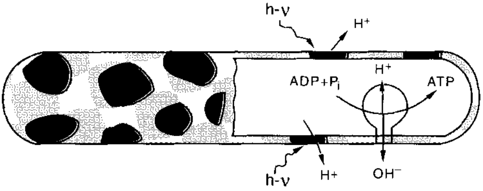


Fig. 12.19 Representación esquemática de *Halobacterium halobium*. Muestra la membrana citoplasmática roja, las manchas purpúreas de la membrana (izquierda) y su función como bomba de protones impulsada por la luz (derecha).

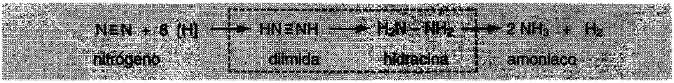
Las células móviles bacilares de *H. halobium* disponen de vesículas gaseosas lenticulares que les dan una gran flotabilidad. Están coloreadas de rojo, naranja o amarillo por carotenoides. Sobre la membrana citoplasmática se distinguen unas manchas de color rojo oscuro con un diámetro de 0,5 mm, de modo que su superficie total representa aproximadamente la mitad de la superficie celular (Fig. 12.19).

Estas manchas corresponden a la llamada **membrana purpúrea**; su coloración se debe al contenido en **bacteriorrodopsina**, semejante a la rodopsina localizada en las células visuales. Este pigmento determina que en la luz se establezca un gradiente de protones entre las caras externa e interna de la membrana. La membrana purpúrea actúa por tanto como una "bomba de protones impulsada por la luz" y conduce al establecimiento de un potencial de membrana electroquímico. El restablecimiento del equilibrio de carga puede ir acoplado a una regeneración de ATP. La membrana purpúrea permite de este modo un tipo especial de fotofosforilación. La energía obtenida en la luz colabora con la obtenida en la oxidacióna aeróbica de los sustratos.

13. Fijación del nitrógeno molecular

Únicamente los procariotas son capaces de captar de la reserva atmosférica de nitrógeno al nitrógeno molecular (N_2) y de fijarlo. En parte en formas de vida libre, en parte en simbiosis con plantas superiores, pueden pasar al N_2 inerte a una combinación orgánica, y lo incorporan directamente o a través de las sustancias celulares a la proteína del suelo. La fijación simbiótica del N_2 por leguminosas posibilita una ganancia de nitrógeno de 100-300 kg N por hectárea y año. Se calcula que los microorganismos de vida libre fijadores de N_2 aportan al suelo entre 1-3 kg N/(Ha.a). Al suelo pueden llegar además cantidades considerables de nitrógeno combinado con las lluvias a partir de la atmósfera; según cual sea el grado de contaminación del aire entre 3-30 kg N/(Ha.a). (Ciclo del nitrógeno, pág. 9 y siguientes.) Medidas y cálculos aproximados indican que en el año 1974 se fijaron en la tierra $175 \cdot 10^6$ tm N, de ellos $90 \cdot 10^6$ tm en tierra de explotación agrícola; $40 \cdot 10^6$ tm N se fijaron por el proceso químico de HABER-BOSCH. La fracción principal de la fijación de N_2 la proporciona la simbiosis de los rizobios.

La fijación biológica del nitrógeno es un proceso de reducción. El sistema de la *nitrogenasa* transfiere 6 [H] al N_2 y libera 2 [H] como hidrógeno molecular. El amoniaco es el primer producto demostrable de la reacción.


$$N{\equiv}N + 8\,[H] \longrightarrow HN{\equiv}NH \longrightarrow H_2N{-}NH_2 \longrightarrow 2\,NH_3 + H_2$$

La diimida y la hidracina se indican exclusivamente para considerar posibles productos intermedios ligados al enzima. Los sistemas enzimáticos de la *nitrogenasa* de muchas bacterias fijadoras de nitrógeno aislados hasta el momento son muy parecidos entre sí. Su característica más importante es la elevada sensibilidad frente al oxígeno, tanto *in situ* como *in vitro*. Hay que tenerla en cuenta en todas las consideraciones.

13.1 Fijación de nitrógeno por bacterias simbióticas

Debido a la elevada ganancia en nitrógeno, la fijación simbiótica de nitrógeno se conoce ya desde antiguo y se ha utilizado en el marco del "barbecho" y del cultivo rotatorio con el nombre de "abonado verde".

BOUSSINGAULT dio los primeros indicios acerca de la incorporación de nitrógeno por parte de los tréboles y de las judías. El establecimiento de la relación entre los nódulos de las leguminosas y la fijación de nitrógeno se debe a HELLRIEGEL y WILFARTH (1886-1888). Las judías sólo crecen en ausencia de nitrógeno combinado si sus raíces presentan nódulos; los nódulos se forman por infección de los pelos radicales por parte de bacterias del suelo (Fig. 13.1).

13.1.1 Nódulos en las raíces de las leguminosas

Las bacterias que provocan los nódulos de las leguminosas, las bacterias de los nódulos, se reúnen en el género *Rhizobium*. Los bacilos de vida libre en el suelo, Gram negativos, son aeróbicos estrictos y crecen con compuestos orgánicos como nutrientes. Algunas cepas pueden crecer autotróficamente con H_2. Según la especificidad por el hospedador y por otras características se diferencian tres subgrupos (Tab. 13.1); cada uno tiene un nombre genérico distinto: (1) *Rhizobium*: a él pertenecen las bacterias de los nódulos de crecimiento rápido de nuestras plantas de cultivo, (2) *Bradyrhizobium japonicum*, el grupo de los simbiontes de la soja de crecimiento lento, y (3) *Azorhizobium caulinodans*, una bacteria que forma nódulos en el tallo.

Casi todas las leguminosas pueden formar nódulos con rizobios. Una determinada cepa de *Rhizobium* puede establecer por lo general una relación simbiótica con varias especies de leguminosas.

Estadios de la nodulación. La simbiosis de las leguminosas con los rizobios no es cíclica. Esto quiere decir que las bacterias no se encuentran en las semillas. Las bacterias penetran en los pelos radicales jóvenes desde el suelo. Cuando los dos miembros de la simbiosis entran en contacto, tiene lugar el **reconocimiento**. Las leguminosas contienen **lectinas**; éstas son glucoproteínas que unen específicamente a polisacáridos. Están muy extendidas en la naturaleza y tienen probablemente en general funciones de reconocimiento. Las interrelaciones entre las lectinas de la pared externa de los pelos radicales jóvenes y los polisacáridos de las capas exteriores de la pared celular de las bacterias se han investigado en la simbiosis entre el trébol y *Rhizobium trifolii*. Se da una unión exclusivamente cuando los dos miembros son los adecuados; no todos los *Rhizobium* pueden unirse a todas las leguminosas y viceversa. Si tiene lugar la fijación, el extremo del pelo radical se curva, las bacterias penetran y crecen como un **cordón de infección**, que está rodeado por un manto de celulosa de la célula radical, e infectan a otras células de la corteza radical. Se destruyen las células normales diploides. Cuando llegan a una célula tetraploide, de las que siempre existe alguna, se reproducen los rizobios, se producen factores de crecimiento y se multiplican las células de la corteza radical. Los **nódulos** son el resultado de esta inflamación de los tejidos provocada por los rizobios con aporte de factores de crecimiento, probablemente citoquininas. Las bacterias se reproducen muy rápidamente, crecen formando

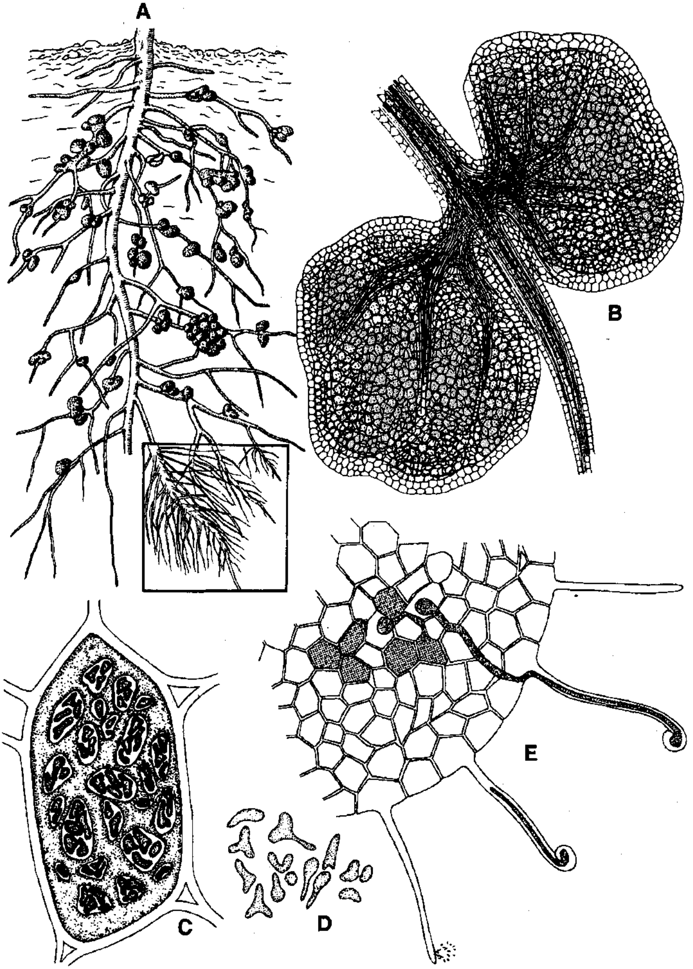


Fig. 13.1 Fijación simbiótica de nitrógeno en los nódulos radicales de las leguminosas. **A** Raíz de guisante con nódulos; **B** corte a través de un nódulo totalmente formado; **C** corte de una célula llena de rizobios; **D** las bacterias contenidas en las células tienen formas diversas (bacteroides); **E** penetración de las bacterias en la punta de un pelo radical y crecimiento del tubo de infección a través de la corteza radical. Dibujos muy esquematizados.

Tab. 13.1 Subgrupos de bacterias formadoras de nódulos en las leguminosas.

Género y especie	Planta
Rhizobium leguminosarum	Guisante
Rhizobium meliloti	Alfalfa
Rhizobium trifolii	Trébol
Rhizobium phaseoli	Judía
Rhizobium lupini	Lupino
Bradyrhizobium japonicum	Soja
Azorhizobium caulinodans	*Sesbania*

células de aspecto irregular, **bacteroides**, que pueden tener un volumen más de 10 veces superior al de los rizobios. Los bacteroides se encuentran, por último, libres o en grupos rodeados por membranas en el citoplasma de las células vegetales. El tejido relleno de bacterias adquiere una tonalidad roja; contiene el pigmento **leghemoglobina**. Al envejecer los nódulos se vuelven verdes, debido a la degradación de la leghemoglobina a pigmentos biliares verdes (biliverdinas). Si muere el nódulo, los rizobios que todavía estaban en un gran número en reposo, se liberan y se multiplican alimentándose de los productos de degradación del nódulo.

Función de los bacteroides y de la leghemoglobina. Los bacteroides fijan nitrógeno. Durante la fase de fijación de nitrógeno los bacteroides son alimentados por la planta con ácidos dicarboxílicos de 4 carbonos, como malato, succinato y fumarato. En contraposición a los rizobios libres, los bacteroides no pueden utilizar azúcares. Los bacteroides secretan iones amonio, que aparentemente establecen un enlace orgánico gracias a la *glutamina-sintetasa* de las células vegetales vecinas (apartado 7.6). La relación planta-*Rhizobium* es por tanto una verdadera simbiosis.

La dependencia mutua de ambos miembros se pone aún más de manifiesto en la **leghemoglobina**, que desempeña un papel esencial en la fijación del N_2. La formación de la leghemoglobina es una capacidad específica de la simbiosis: el grupo prostético, el protohemo, es sintetizado por los bacteroides, la parte proteica por el vegetal. La leghemoglobina es semejante a la mioglobina y en los nódulos se presenta predominantemente en la forma de hierro (II); tiene una elevada afinidad por el oxígeno. Se puede considerar que la leghemoglobina facilita el **transporte del oxígeno** desde la membrana envolvente a través de un espacio sin posibilidad de convección hasta la superficie de los bacteroides, e incrementa, por tanto, la velocidad del transporte de oxígeno. Sus características garantizan que los bacteroides dispongan de suficiente oxígeno para la ganancia energética y para el crecimiento, sin que se den presiones parciales de O_2 excesivamente elevadas que influirían en la fijación de N_2 por los bacteroides. La presencia de leghemoglobina asegura aparentemente una protección total frente a las lesiones del sistema enzimático fijador de N_2 por el oxígeno (véase apartado 13.3). Los rizobios son las únicas bacterias fijadoras de N_2 que disponen de una *hidrogenasa* (aunque no todas las cepas) que tiene una función protectora frente al oxígeno. Es poco probable que los rizobios de vida libre sean capaces de fijar N_2 en el suelo. Tan sólo en pocas cepas de *Rhizobium* se ha podido demostrar actividad *nitrogenasa* en colonias cultivadas sobre agar. La formación de la *nitrogenasa* es dependiente de la presión parcial de O_2 en las colonias.

Nódulos en el tallo. En algunas leguminosas aparecen nódulos en el tallo. Éstas albergan cepas de rizobios, que se reúnen en *Azorhizobium caulinodans*. Estas leguminosas, p. ej. *Sesbania rostrata*, crecen en hábitats húmedos del África tropical y de la India. Los nódulos aparecen en tallos aéreos y sumergidos. El conocimiento de esta simbiosis en el tallo aún es muy reciente. Se espera que la sensibilidad frente al O_2 del sistema de fijación del N_2 sea menor que en otros sistemas.

13.1.2 Nódulos en las raíces de no leguminosas

Existe también una serie de dicotiledóneas superiores, que no pertenecen a las leguminosas, que disponen de nódulos radicales capaces de fijar N_2. La fijación de N_2 se basa igualmente en una simbiosis con procariotas. En la mayoría de los casos el endosimbionte es aquí un actinomiceto, y pertenece al género *Frankia.*

Entre las plantas que albergan actinomicetos se cuentan tanto leñosas como herbáceas. Están extendidas por todo el mundo y aparecen como plantas pioneras en los hábitats pobres en nitrógeno. El aporte de nitrógeno de por lo menos algunas de esta plantas supone 150-300 kg N/(Ha.a) y es por tanto de una gran importancia económica. Entre las plantas fijadoras de N_2 más efectivas se cuentan la casuarina (*Casuarina equisetifolia*), el aliso (*Alnus*), el espino amarillo (*Hippophae*) y *Ceanothus*; menos efectivos son el mirto de Bravante (*Myrica*), *Dryas*, el árbol del paraíso (*Elaeagnus*) y *Shepherdia.*

En las plantas leñosas los nódulos radicales pueden alcanzar el tamaño de una pelota de tenis. Se trata de raíces ramificadas en forma de coral, muy imbricadas, que han detenido su crecimiento. En *Casuarina* los nódulos forman un manojo de raíces engrosadas con crecimiento geotrópico negativo. Las bacterias simbióticas infectan exclusivamente las células del parénquima cortical. Igual que en las leguminosas la infección de las raíces tiene lugar a partir del suelo y por los pelos radicales. Tienen en común con los nódulos de las leguminosas la presencia de leghemoglobina. Tan sólo recientemente se ha demostrado una cepa de *Rhizobium* como endosimbionte en una planta que no pertenece a las leguminosas, *Parasponia parviflora* (un olmo). Esta cepa pudo transferirse incluso a leguminosas. Los nódulos fijan nitrógeno activamente.

13.1.3 Simbiosis con cianobacterias fijadoras de N_2

Las cianobacterias (pág. 135 y sig.) también establecen simbiosis con plantas superiores comportándose como el miembro fijador de N_2. En el helecho acuático *Azolla* que se encuentra en la superficie de las aguas tropicales estancadas, se han encontrado cianobacterias en huecos entre los tejidos de las hojas. El simbionte es *Anabaena azollae*. Mientras que las especies de vida libre de *Anabaena* únicamente contienen pocos heterocistos (5%) en los tricomas de *Anabaena* simbióticas se presentan hasta un 15-20% de heterocistos. Esta relación indica ya por sí sola una fijación efectiva de N_2. Medidas de la actividad de la *nitrogenasa* confirman esta suposición. *Azolla* crece sobre la superficie de las aguas de los campos de arroz inundados y si se trabaja convenientemente pueden cubrir todos los requerimientos de los arrozales en cuanto a nitrógeno. La ganancia en cuanto a nitrógeno en la simbiosis de *Anabaena* con *Azolla* supone unos 300 kg N/(Ha.a). Entre los musgos hepáticos (*Blasia pusilla*, *Anthoceros punctatus*, *Peltigera*) y *Nostoc* se establece una simbiosis semejante.

En el arbusto tropical *Gunnera macrophylla* se encuentra *Nostoc punctiforme* en la zona inferior del tallo, localizado en unas drusas especiales en el inicio del peciolo foliar. Este *Nostoc* también forma heterocistos y sintetiza *nitrogenasa*.

13.2 Fijación de nitrógeno por bacterias de vida libre y cianobacterias

La capacidad para fijar el N_2 está ampliamente extendida entre las bacterias de los suelos y las aguas. En todos los grupos fisiológicos hay algún representante capaz de fijar nitrógeno más o menos eficientemente. La gran mayoría de las bacterias pertenecientes a los grandes grupos de procariotas fototróficos, las bacterias rojas del azufre y sin azufre, así como las cianobacterias, son capaces de fijar N_2 (Tab. 13.2). Esta capacidad es de significación ecológica. Como bacterias fijadoras de nitrógeno se han reconocido *Xanthobacter autotrophicus*, *Alcaligenes latus* y *Derxia gummosa* entre las bacterias autotróficas, *Klebsiella pneumoniae* y *Bacillus polymyxa* entre las anaeróbicas facultativas, clostridios, metanógenos y reductoras de sulfatos (sulfurógenas) entre los anaeróbicos estrictos. La

Tab. 13.2 Algunas bacterias de vida libre fijadoras de nitrógeno. Grupos fisiológicos, géneros y especies.

Aeróbicos respiratorios estrictos	Respiratorios anaeróbicos	Fototróficos
Azotobacter chroococcum	**Desulfuricantes**	**Anoxigénicos**
Azotobacter vinelandii	*Desulfovibrio*	*Chromatium*
Azomonas agilis	*Desulfotomaculum*	*Rhodospirillum*
Alcaligenes latus		*Rhodopseudomonas*
Xanthobacter autotrophicus	**Metanógenos**	*Rhodobacter*
Beijerinckia indica	*Methanobacterium*	*Heliobacter*
Derxia gummosa	*Methanosarcina*	*Chlorobium*
Azospirillum lipoferum		
Varios metilotrofos		
Anaeróbicos facultativos	**Fermentadores obligados**	**Oxigénicos**
Klebsiella pneumoniae	*Clostridium*	Mayoría de cianobacterias
Bacillus polymyxa		

demostración sin ninguna duda de la fijación de N_2 en los metanógenos, pertenecientes a las arqueobacterias, fue muy sorprendente. La investigación de un gran número de bacterias se ha facilitado en gran manera por la introducción de la técnica isotópica (demostración de ^{15}N) y de la cromatografía gaseosa, con cuya ayuda se demuestra fácilmente el etileno formado a partir del acetileno por los fijadores de N_2. No obstante, la demostración se sigue haciendo todavía por comprobación del crecimiento. Es posible que incluso la mayoría de las bacterias dispongan de la información genética para la fijación del N_2, pero que los genes no se expresen como consecuencia de adaptaciones a determinados hábitats.

Mientras que la mayoría de los fijadores de N_2 aeróbicos únicamente pueden fijarlo bajo presiones parciales de O_2 bajas, el grupo de *Azotobacter* está adaptado al aire. *Azotobacter chroococcum*, *A. vinelandii*, *Beijerinckia indica*, *Derxia gummosa* y *Azomonas agilis* pertenecen por tanto a las bacterias fáciles de aislar, incubando, bajo atmósfera de aire un medio de cultivo sin nitrógeno inoculado con agua o suelo. *A. chroococcum* es significativamente más abundante en suelos pobres en nitrógeno que en los abonados, ricos en nitrógeno.

En las rizosferas de algunas plantas se encuentran acúmulos de bacterias fijadoras de N_2; entre ellas, *Azotobacter paspali* en las raíces superficiales de *Paspalum notatum* y *Azospirillum lipoferum* en la rizosfera de *Digitaria decumbens*. Como los dos miembros obtienen un beneficio, esta asociación se califica de simbiosis.

La fijación de nitrógeno por las cianobacterias de vida libre es de una significación no despreciable, por lo menos en los arrozales [30-50 kg N/(Ha.a)]. En aproximadamente 40 especies de cianobacterias se ha podido demostrar en cultivo puro la capacidad para fijar N_2. Las cianobacterias se cuentan entre los pioneros en la colonización de suelos pobres (volcánicos) y se encuentran en ambientes extremos, como la Antártida a temperaturas próximas a la congelación, y en fuentes termales. Viven de forma aislada o en simbiosis con hongos en forma de líquenes. En las aguas continentales y en zonas del mar se dan anualmente las llamadas "floraciones", desarrollos masivos de cianobacterias bien conocidos. Aún no ha podido calcularse qué porcentaje de ganancia de nitrógeno y de producción de biomasa corresponde a las cianobacterias en el mar.

Oligoelementos necesarios para la fijación de nitrógeno. Para la fijación de N_2 se requiere molibdeno y níquel. Hay dos procesos en los que las bacterias requieren **molibdeno**: la **fijación de N_2** y la **reducción de nitratos**. Los enzimas clave para ambos procesos son molibdoproteínas. El **níquel** es un componente de las *hidrogenasas*. Como todos los fijadores de N_2 disponen de una *hidrogenasa* (excepto algunos rizobios) el níquel es de gran importancia para todos los fijadores de N_2.

Ya hace 50 años que H. BORTELS descubrió que el molibdeno era necesario para la fijación del N_2, y que a veces se puede sustituir por vanadio. Los trabajos genéticos han demostrado que *Azotobacter vinelandii* y *Xanthobacter autotrophicus* disponen de dos agrupaciones de genes, una que codifica para la síntesis de una *nitrogenasa* que contiene molibdeno, y la otra para la formación de otra *hidrogenasa* que contiene vanadio. Totalmente inesperada fue la comprobación de que también hay actividad sin oligoelementos, y *A. vinelandii* puede fijar N_2 incluso cuando se han deleccionado los genes para las dos *nitrogenasas* (dependientes de Mo y V). La *nitrogenasa* que se forma entonces es una simple proteína sulfoférrica.

13.3 Bioquímica de la fijación de nitrógeno

La fijación de nitrógeno transcurre en un sistema enzimático, el sistema de la *nitrogenasa*; tiene dos componentes, la *nitrogenasa* y la *nitrogenasa-reductasa* (Fig. 13.2). Ambos componentes están asociados y se localizan en el citoplasma y son extraordinariamente sensibles al óxigeno. Esta característica justifica el por qué las bacterias anaeróbicas facultativas únicamente fijan nitrógeno en condiciones anóxicas, las cianobacterias sólo en los heterocistos y los rizobios sólo en presencia de leghemoglobina. Ambos componentes son proteínas sulfoférricas. La *nitrogenasa* es el componente mayor y tiene cuatro subunidades (α_2, β_2) cada una de las cuales contiene un átomo de **molibdeno**. Las proteínas tienen un potencial

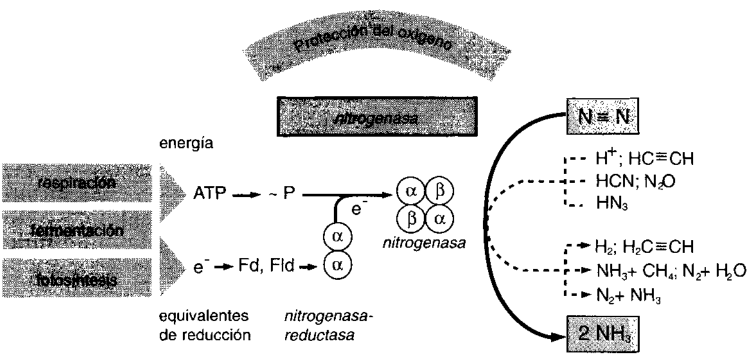

protección del oxígeno
nitrogenasa
energía
respiración
fermentación
fotosíntesis
ATP → ~P
e⁻
α β
β α
nitrogenasa
e⁻ → Fd, Fld →
α
α
equivalentes de reducción
nitrogenasa-reductasa
N≡N
H⁺; HC≡CH
HCN; N₂O
HN₃
H₂; H₂C≡CH
NH₃+ CH₄; N₂+ H₂O
N₂+ NH₃
2 NH₃

Fig. 13.2 Esquema general de la fijación de nitrógeno. Fd = ferredoxina; Fld = Flavodoxina.

redox negativo. Los electrones suministrados por la ferredoxina y la flavodoxina se transfieren primero a la *nitrogenasa-reductasa*, y posteriormente con consumo de ATP (unos 16 mol ATP/mol N_2) a la *nitrogenasa*. Esta proteína molibdénica cataliza la verdadera reducción del N_2. Simultáneamente se reducen 2 H^+ a H_2. El sistema enzimático no sólo reduce N_2, sino también acetileno (etino), azida, óxido nitroso, cianuro, nitrilos, isonitrilos y protones.

La técnica metodológicamente más simple para demostrar la *nitrogenasa* se basa en la reducción del acetileno. El acetileno es reducido a etileno (eteno) que puede determinarse cuantitativamente de una forma muy cómoda mediante cromatografía de gases. Hasta ahora todas las bacterias fijadoras de N_2 y sistemas simbióticos reducen el acetileno. El sistema alternativo de la *nitrogenasa*, que tiene vanadio como metal pesado característico, reduce aún un paso más el acetileno, hasta el etano. Por ello, ambos sistemas pueden diferenciarse bien *in vivo*.

La **energía** necesaria en forma de ATP para la fijación de N_2 puede suministrarse por **fermentación**, **fotosíntesis** o **respiración** (Fig. 13.2). Las cantidades necesarias de poder reductor y de ATP son tan altas, que se manifiestan en los rendimientos celulares de crecimiento. Si, por ejemplo, se cultiva una bacteria fijadora de nitrógeno con una cantidad limitada de azúcar en un medio con amonio y otro sin él, el rendimiento del crecimiento es superior en el primero, en el que no tiene que fijar N_2.

Papel de la hidrogenasa. El sistema de la *nitrogenasa* de todas las bacterias produce H_2 además de NH_3; se consideró este hecho inicialmente como sorprendente, ya que parecía que se desperdiciaba poder reductor. El hecho de que todas las bacterias fijadoras de N_2 dispongan de una *hidrogenasa* ligada a membranas, parece apoyar que tiene una **función protectora** para el sistema de la *nitrogenasa* sensible al oxígeno. El hidrógeno parece utilizarse para reducir el oxígeno que difunde a la célula y "desactivarlo" en forma de agua (Fig. 13.3).

Esto está en consonancia con la demostración de H_2 en la capa de aire próxima a los campos de tréboles. Muchos rizobios, entre ellos *R. trifolii*, no contienen ninguna *hidrogenasa*, por lo que no pueden activar el H_2 y éste pasa a la célula vegetal y a la atmósfera. Es comprensible que a muchos rizobios les falte la *hidrogenasa* porque en ellos la protección frente al oxígeno se la proporciona la leghemoglobina y no existe ninguna presión de selección para un segundo sistema de protección. Medidas de rendimientos en soja inoculadas con una cepa de *Bradyrhizobium japonicum* formador de *hidrogenasa* (a) y con un mutante sin *hidrogenasa* de la misma cepa (b) indican que la reutilización del hidrógeno producido por el sistema de la *nitrogenasa* conlleva una ganancia energética en la célula y un aumento en el rendimiento. La presencia simultánea de *nitrogenasa* e *hidrogenasa* en todas las bacterias fijadoras de N_2 (incluidos los rizobios) es de importancia secundaria desde el punto de vista de la eficiencia energética; lo esencial es la función protectora.

Regulación de la fijación de N_2. La *nitrogenasa* es sintetizada en muchas bacterias únicamente en aquellas condiciones en las que es necesaria para el crecimiento, esto es, en ausencia de una fuente utilizable de nitrógeno

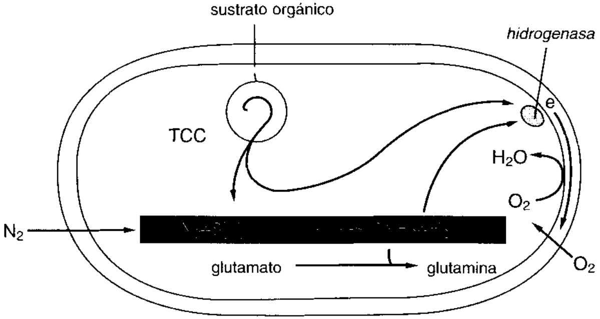


Fig. 13.3 Fijación de nitrógeno en algunas células con respiración aeróbica. Se indica el catabolismo del sustrato, la reacción catalizada por el sistema de la *nitrogenasa* (rojo), la transferencia del NH_3 a un enlace orgánico y el papel del H_2. El H_2 incrementa el consumo del oxígeno que difunde al interior de la célula y contribuye a la protección de la *nitrogenasa*.

combinado. Los iones amonio reprimen la síntesis de la *nitrogenasa*. En algunas bacterias la actividad del enzima ya presente puede verse también disminuida por los iones amonio. En la regulación de la síntesis de la *nitrogenasa* aporta aparentemente un papel importante la *glutamina-sintetasa* (apartado 7.6). La *glutamina-sintetasa* y la *glutamato-sintasa* sirven a la bacteria para transferir iones amonio a un compuesto orgánico, cuando estos iones se encuentran en baja concentración. Este sistema tiene una elevada afinidad por los iones amonio y determina que su concentración celular sea baja. Al elevarse la concentración de los iones amonio en el entorno y por tanto también en el interior de la célula, tiene lugar una represión de la síntesis de la *glutamina-sintetasa* y como consecuencia de la *nitrogenasa*.

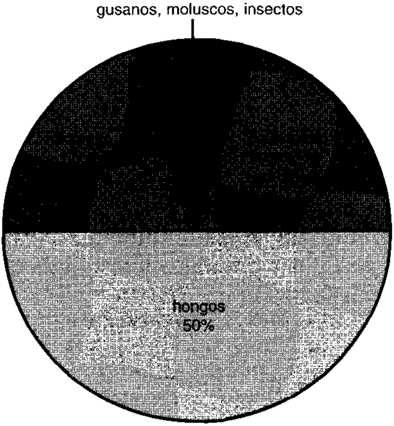
Transferencia genética de los genes *nif*. La capacidad de fijar N_2 pudo transferirse de una bacteria a otra por contacto directo entre las células. Esa transferencia de los genes *nif* de *Klebsiella pneumoniae* a *Escherichia coli* por conjugación y la localización de los genes *nif* en un plásmido dan pie a la esperanza de que los genes *nif* puedan ser transferidos a otras especies bacterianas y quizás incluso a organismos eucarióticos. Como para la fijación de N_2 hacen falta además de la *nitrogenasa* otras proteínas sulfoférricas específicas y se ha de asegurar la protección de la *nitrogenasa* frente al oxígeno, estos experimentos están sometidos todavía a grandes dificultades.

14. Degradación de los productos naturales

Aunque hace ya muchos millones de años que las plantas verdes sintetizan compuestos orgánicos a partir del anhídrido carbónico, ninguno de estos compuestos ha llegado a acumularse en cantidades considerables. Tan sólo una ínfima fracción se ha conservado en condiciones anaeróbicas en forma de compuestos de carbono fuertemente reducidos presentes en el petróleo, gas natural y carbones. En condiciones aeróbicas todos los compuestos formados biosintéticamente son degradables. Para cada compuesto, por complicado que sea, existe un microorganismo capaz de degradarlo total o parcialmente; los fragmentos que surgen de esta forma son utilizados por otras especies. Los microorganismos se presentan pues en conjunto como **omnipotentes bioquímicamente** y se habla de un "principio de infalibilidad microbiana". Recientemente ha resultado necesario limitar dicho principio. Algunos compuestos de bajo peso molecular creados y sintetizados por el hombre y algunos polímeros sintéticos de alto peso molecular resisten la degradación microbiana, afirmación que constituye el resultado de varios años de observaciones y estudios.

El conocimiento de los microorganismos que atacan, degradan y transforman un solo producto natural se basa fundamentalmente en los estudios realizados con los **cultivos de enriquecimiento**. Los medios de cultivo básicos, simples, a los que se les ha añadido como fuente de energía el compuesto que quiere estudiarse sólo permiten el crecimiento de microorganismos con necesidades nutritivas relativamente sencillas; en los cultivos de enriquecimiento líquidos sólo prevalecen además los organismos con una mayor velocidad de crecimiento en las condiciones dadas. Tiene pues que ponerse totalmente en duda que dichas formas puedan considerarse como los representantes típicos de los organismos que en la naturaleza efectúan dichos procesos de degradación. Muchos organismos con otras características fisiológicas de crecimiento pueden pues no ser reconocidos de esta forma. La degradación de los compuestos orgánicos que llegan al suelo no se realiza únicamente por las bacterias, sino que también están implicados microorganismos eucarióticos y pequeños animales (helmintos, moluscos e insectos) (Fig. 14.1). El aclarar las redes tróficas aeróbicas es un objetivo de la ecología microbiana.

Degradación bajo condiciones anaeróbicas y aeróbicas. Una gran parte de la biomasa producida por la fotosíntesis se mineraliza en **condiciones anaeróbicas**. Además de los sedimentos de las aguas mencionados en varias ocasiones, se establecen ecosistemas anaeróbicos en los arrozales,



14.1 Composición aproximada de la biomasa del suelo.

pantanos y tundras, así como en los suelos permanentemente húmedos, vertederos de basuras, biodigestores de las depuradoras y los tractos intestinales de todos los animales. Se han estudiado intensamente los microorganismos implicados en la mineralización anaeróbica. Se pueden ordenar los organismos y los procesos en una "cadena trófica anaeróbica" (pág. 295, 352). Se han podido caracterizar las interrelaciones entre los organismos implicados como simbiosis, sintrofismo, transferencia interespecífica de hidrógeno y cometabolismo, y se ha conseguido un cuadro completo. Este éxito fue posible porque en las transformaciones anaeróbicas prácticamente sólo intervienen las bacterias.

La proporción mayoritaria de la biomasa se mineraliza en **condiciones aeróbicas**. En la mineralización aeróbica participan procariotas y eucariotas, predominando estos últimos, tanto por la cantidad de los organismos implicados como por la cantidad de la biomasa transformada. Por ello, el flujo de la degradación aeróbica es desigual y más ramificado que la "cadena trófica anaeróbica". A esta última no habría que oponer una cadena, sino una "red trófica aeróbica" de mineralización. En esta red están ampliamente representados los pequeños animales –principalmente invertebrados, como helmintos, moluscos, insectos y sus larvas–. De todos modos, hay que reconocer que en los tractos intestinales de los animales siempre participan los microorganismos en el procesado de los alimentos, como mínimo en la transformación de los materiales fibrosos, como la lignocelulosa y la celulosa, que representan más de la mitad de la biomasa fotosintética producida. Hasta ahora no se han descrito ni investigado los procesos y los microorganismos en los intestinos de los animales implicados, ni desde el punto de vista bioquímico ni de la dinámica de poblaciones. El intestino de las termitas es una excepción satisfactoria. Por ello parece urgente una investigación más intensa de la degradación aeróbica de la biomasa primaria.

14.1 Celulosa

La celulosa es el componente básico de los vegetales y su producción supera a la de los demás productos naturales; aproximadamente la mitad de la biomasa producida fotosintéticamente es celulosa. Los restos vegetales presentes en el suelo están formados por un 45% de celulosa (valor promedio) – 90% (algodón), por lo que la celulosa ocupa, junto con el CO_2, una posición central en el ciclo del carbono (pág. 7).

La celulosa está compuesta por cadenas de unidades de ß-D-glucopiranosa unidas por enlaces 1,4-glucosídicos con un grado de polimerización (unidades de glucosa por molécula de celulosa) máximo de 14 000 en los vegetales y de 3500 en *Acetobacter xylinum*. En el alga verde *Valonia* se encontró una celulosa con un grado de polimerización de 25 000. La unidad elemental desde el punto de vista estructural no es la glucosa, sino el disacárido celobiosa. La celulosa es parcialmente cristalina, esto es, hay zonas cristalinas que se alternan con otras amorfas. Con referencia a las zonas cristalinas la celulosa presenta un polimorfismo acentuado; debido a la diferente ordenación de las cadenas de celulosa en la red cristalina se diferencia celulosa tipo I (celulosa nativa) y celulosa tipo II (algodón mercerizado). La elevada firmeza e insolubilidad de la celulosa se alcanza a nivel molecular por la formación de puentes de hidrógeno inter- e intramoleculares. Los primeros unen entre sí a las cadenas individuales y éstas a su vez se estabilizan por puentes de H intramoleculares (hay dos por molécula de glucosa). Resulta una red bidimensional de puentes de H. El mantenimiento de cada red plana se basa en fuerzas de VAN DER WAALS (celulosa I) o en el caso de la celulosa II también por puentes de H. Así resulta una red tridimensional de puentes de H.

La **rotura enzimática** de la celulosa está provocada por *celulasas*. Investigaciones realizadas en hongos demuestran que el sistema de la *celulasa* está constituido por lo menos por tres enzimas: 1. Las *endo-β-1,4-glucanasas* atacan los enlaces β-1,4 en el interior de la macromolécula simultáneamente y determinan la formación de grandes fragmentos de cadenas con los extremos libres. 2. Las *exo-β-1,4-glucanasas* van eliminando de los extremos no reductores de la cadena al disacárido celobiosa. 3. Las *β-glucosidasas* hidrolizan la celobiosa con formación de glucosa.

La **regulación de la síntesis de la celulasa** puede estar sometida tanto a una represión por catabolito como a una inducción por sustrato de la celobiosa, sintetizándose de forma constitutiva pequeñas cantidades de *celulasa*. Depende de cada organismo las concentraciones que actúan como inductoras o represoras. En general, las concentraciones bajas de celulosa actúan como inductoras, mientras que las altas reprimen. A nivel de proteína, la celobiosa actúa además como un inhibidor competitivo. La celulosa sola por sí misma no tiene ninguna acción directa sobre la síntesis, por tratarse de una sustancia insoluble en agua, pero sí indirectamente a través de celobiosa liberada a partir de la celulosa. Así puede explicarse la acción inductora de la celulosa cristalina.

Degradación en condiciones aeróbicas. En los suelos bien aireados la celulosa es degradada y utilizada por microorganismos aerobios (hongos, mixobacterias y otras eubacterias), mientras que en condiciones anaeróbicas lo es por bacterias, algunos hongos anaeróbicos y por protozoos.

En condiciones aeróbicas los **hongos** participan de forma esencial en la degradación de la celulosa. Resultan superiores a las bacterias especialmente en suelos ácidos y en la degradación de la celulosa incrustada con lignina (madera). Las especies de los géneros *Fusarium* y *Chaetomium* tienen un papel considerable. También son celulolíticos: *Aspergillus fumigatus* y *A. nidulans, Botrytis cinerea, Rhizoctonia solani, Trichoderma viride, Chaetomium globosum* y *Myrothecium verrucaria*. Las tres últimas

Tab. 14.1 Microorganismos degradadores de la celulosa.

Eucariotas		Procariotas	a
Aspergillus fumigatus	a	*Cytophaga*	a
Aspergillus nidulans	a	*Sporocytophaga*	a
Botrytis cinerea	a	*Archangium, Sorangium*	a
Chaetomium globosum	a	*Polyangium*	a
Fusarium	a	*Pseudomonas fluorescens* var. *cellulosa*	a
Myrothecium verrucaria	a	*Cellulomonas fimi*	a
Trichoderma viride	a	Algunos estreptomicetos	a
Trichoderma reesei	a	*Cellvibrio flavescens*	a
Rhizoctonia solani	a	*Clostridium thermocellum*	b
Neocallimastix frontalis	b	*Clostridium cellobioparum*	b
		Ruminococcus albus, R. flavefaciens	b
Diplodinium	b	*Bacteroides succinogenes*	b
Entodinium	b	*Butyrivibrio fibrisolvens*	b
		Eubacterium cellulosolvens	b

a = aeróbico, b = anaeróbico.

especies mencionadas también se utilizan para determinar la degradación de la celulosa y para probar los medios de impregnación empleados para proteger los tejidos y las cubiertas de la acción destructora de los microorganismos que degradan la celulosa. Los hongos segregan *celulasas* que pueden separarse del micelio y del medio de cultivo.

Cytophaga y *Sporocytophaga* son las **bacterias aeróbicas** que degradan la celulosa que se obtienen con mayor facilidad con las técnicas habituales con medios de enriquecimiento en estado líquido. Se sabe poco acerca de la utilización y de la forma en que las mixobacterias atacan la celulosa. Nunca se ha probado la existencia de una *celulasa* extracelular ni tampoco de productos de hidrólisis de la celulosa. Las bacterias se disponen según el eje longitudinal paralelo a la dirección de las fibras; aparentemente sólo hidrolizan la celulosa en contacto estrecho con el filamento y utilizan en seguida los productos de la hidrólisis. Otras mixobacterias con cuerpos fructíferos de los géneros *Polyangium, Sorangium* y *Archangium* pueden crecer sobre celulosa.

La capacidad de crecer con celulosa como sustrato parece que está también extendida en otras muchas bacterias aeróbicas que se podrían calificar de "omnívoras". Algunas atacan aparentemente la celulosa cuando faltan otras fuentes de carbono. Otras bacterias semejantes a *Pseudomonas* se reunieron anteriormente en el grupo de *Cellvibrio*. Recientemente se ha descrito *Pseudomonas fluorescens* var. *cellulosa*. Entre las bacterias corineformes hay que citar especies de *Cellulomonas*. Entre los actinomicetos sólo se han descrito unas pocas especies celulolíticas: *Micromonospora chalcea, Streptomyces cellulosae, Streptosporangium.*

Degradación en condiciones anaeróbicas. En condiciones anaeróbicas la celulosa es degradada por eubacterias mesófilas y termófilas y también por algunos hongos y protozoos. La especie termófila *Clostridium thermocellum* crece en un medio sintético sencillo con celulosa o celobiosa como sustrato y sales de amonio como fuente de nitrógeno; no transforma ni glucosa ni otros muchos azúcares. Al igual que se observa en otras bacterias anaeróbicas celulolíticas, la degradación de la celulosa va precedida por la segregación de una sustancia amarillenta que contiene carotenoides y que incrementa la afinidad de los enzimas celulolíticos por la celulosa. La coloración amarillenta de la celulosa es indicación del inicio de su hidrólisis. Los complejos multienzimáticos anteriormente señalados están organizados en *C. thermocellum* en los llamados celulosomas, cuyo peso molecular alcanza varios millones. Entre los productos de la fermentación de la celulosa se encuentran el etanol, ácido acético, ácido fórmico, ácido láctico, hidrógeno molecular y anhídrido carbónico. La celulosa es hidrolizada extracelularmente hasta glucosa. En la fermentación de la celulosa por la especie mesófila *Clostridium cellobioparum* se obtienen productos

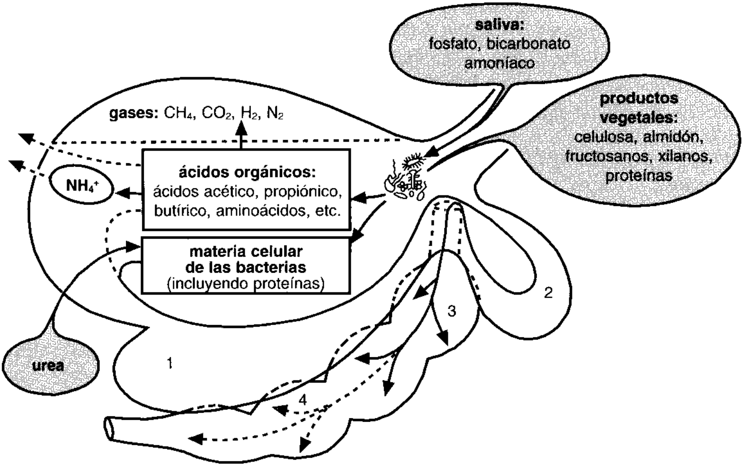

saliva:
fosfato, bicarbonato
amoníaco
productos
vegetales:
celulosa, almidón,
fructosanos, xilanos,
proteínas
gases: CH₄, CO₂, H₂, N₂
NH₄⁺
ácidos orgánicos:
ácidos acético, propiónico,
butírico, aminoácidos, etc.
materia celular
de las bacterias
(incluyendo proteínas)
urea
1
2
3
4

Fig. 14.2 Representación esquemática de las transformaciones microbianas que se llevan a cabo en el estómago de los rumiantes (panza). 1 panza, **2** redecilla, **3** libro, **4** cuajar; para aclaraciones consúltese el texto.

análogos en la fermentación. El largo bacilo Gram negativo conocido como *Bacillus cellulosae-dissolvens* se adhiere íntimamente a los filamentos de celulosa –de forma análoga a como lo hacen las especies de *Cytophaga*– y no segrega *celulasa* al medio.

Transformaciones microbianas en la panza. En la panza de los rumiantes la celulosa es degradada por bacterias anaeróbicas, hongos y protozoos. Las principales fuentes de hidratos de carbono de los rumiantes son el heno, la paja y la hierba. Cerca del 50% de la hierba seca está formada por fructosanos y xilanos, el resto de los hidratos de carbono consiste en celulosa. La celulosa integrante del alimento no sería utilizable si en el curso de la evolución no se hubiese producido en los rumiantes una *relación* simbiótica con microorganismos algunos de los cuales pueden degradar la celulosa (Fig. 14.2).

Las dos primeras partes del estómago de los rumiantes, esto es, panza y redecilla, constituyen una inmensa cámara de fermentación de unos 100-250 litros de volumen, en la que se dan las condiciones ideales para el crecimiento de numerosos microorganismos. El animal contribuye a dicha simbiosis: una temperatura constante de 37°C a 39°C, el aporte continuo de un medio mineral (cerca de 70 litros de saliva por día) bien tamponado (pH 5,8 hasta 7,3) gracias al bicarbonato y fosfato, un aporte periódico de sustratos nutritivos en forma de alimento bien triturado y rico en celulosa y un mezclado mecánico gracias a los movimientos del estómago. Así pues, la panza puede ser considerada un **cultivo semicontinuo** de microorganismos.

Entre los microorganismos presentes en la panza predominan los **protozoos** y las **bacterias**. En 1 ml de contenido de la panza se encuentran unos cuantos millones de protozoos, predominantemente ciliados de los géneros *Diplodinium* y *Entodinium*. Se trata de especies específicas poco frecuentes fuera de la panza. En la panza constituyen del 6 al 10% en peso, del que una parte está constituida por polisacáridos almacenados. Así pues, su papel en la panza no puede ser vital.

Los habitantes funcionalmente más importantes de la panza de los rumiantes son **bacterias**; en 1 ml del jugo de la panza hay hasta 10^{11} células y constituyen de un 5 a un 10% (del peso seco) del contenido de la panza. Las bacterias específicas de la panza son estrictamente anaerobias.

Las bacterias degradan los hidratos de carbono poliméricos del alimento a compuestos sencillos del tipo de los ácidos grasos y de los alcoholes. A partir de la celulosa, almidón, fructosanos y xilanos se forman predominantemente **ácidos grasos**. De acuerdo con las medidas realizadas se degrada un 90% de la celulosa incorporada. Como resultado de dicha degradación se forman grandes cantidades de ácidos, principalmente acetato (50-70%), propionato (17-21%), butirato (14-20%) y poco valeriato y formiato. Se producen además diariamente hasta 900 litros de gas; los porcentajes volumétricos aproximados son de 65% (v/v) de anhídrido carbónico, 27% metano, 7% nitrógeno, 0,18% hidrógeno y trazas de sulfhídrico. Como las bacterias anaerobias aisladas en los últimos años a partir de la flora de la panza degradadoras de celulosa también la fermentan en condiciones de laboratorio dando lugar a los mismos ácidos y en proporciones análogas, parece cierta la hipótesis de que los ácidos de la panza se forman durante la degradación microbiana de la celulosa.

En la panza degradan la celulosa: *Ruminococcus albus* y *R. flavefaciens,* cocos Gram negativos; *Fibrobacter succinogenes,* un bacilo inmóvil Gram negativo que fundamentalmente forma acetato y succinato; *Butyrivibrio fibrisolvens; Clostridium cellobioparum.*

La falta de lactato en la panza tiene que atribuirse a la presencia de *Veillonella alcalescens (= Micrococcus lactilyticus)* que fermenta el lactato formando propionato, acetato, hidrógeno molecular y anhídrido carbónico. El **metano** formado en la degradación de la celulosa tiene su origen en los ácidos grasos y en el hidrógeno molecular y el anhídrido carbónico (pág. 351 y sig). La formación de ácido sulfhídrico en la panza se debe a *Desulfotomaculum ruminis* que reduce los sulfatos. *Selenomonas* *ruminantium* (Fig. 2.37B) fermenta la glucosa dando lactato, acetato y propionato. Entre los hongos anaeróbicos que habitan la panza, el mejor estudiado es *Neocallimastix frontalis* (quitridiomiceto). Degrada la celulosa a glucosa y la fermenta a acetato, formiato, etanol, lactato, CO_2 e H_2.

El alimento de los rumiantes en su hábitat natural, sabanas y estepas, es muy pobre en nitrógeno y en proteínas. A fin de asegurar la síntesis proteica por parte de los simbiontes de la panza se ha formado en los rumiantes un ciclo muy importante, el "ciclo ruminohepático": la urea que se forma en el hígado a partir del amoniaco sólo es parcialmente excretada con la orina; una parte de la urea pasa por secreción de las glándulas salivales al esófago y la pared gástrica con lo que resulta accesible a la síntesis proteica que es llevada a cabo por la flora de la panza (Fig. 14.2). Debido a la simbiosis de los rumiantes con la microflora de la panza estos animales son "proteinautarcas"; se ha mostrado repetidamente que las vacas pueden ser alimentadas con comida carente de proteína.

Las bacterias contribuyen de dos formas a la nutrición de los rumiantes: los ácidos formados durante la degradación de los polisacáridos son reabsorbidos en la panza. La sustancia celular de las bacterias es degradada en el intestino y también es reabsorbida. La *lisozima* segregada por el epitelio del estómago participa en la lisis de las bacterias. Como las bacterias que viven en la panza también utilizan el nitrógeno inorgánico, la obtención de proteína se eleva de forma esencial.

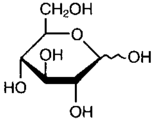
Saturación de las grasas. Los ácidos grasos de las grasas vegetales se diferencian de los de los animales por su bajo grado de saturación; contienen ácido oleico, oleínico, linoico, linoleico y araquidónico, y son de menor consistencia (punto de fusión más bajo). En los animales que no disponen de panza se asimilan en el intestino los ácidos grasos procedentes de los alimentos y se incorporan sin modificar a las grasas de reserva (cerdos, roedores, gansos). Por ello las grasas son blandas. En los animales con panza las grasas vegetales son ampliamente hidratadas (saturadas), y estos ácidos grasos saturados se reabsorben en el intestino e incorporan a las grasas. Las grasas de las terneras (mantequilla, sebo) son por eso consistentes. Considérese que no tan sólo se han transformado las grasas por las bacterias en la panza, sino que también del 60 al 90% (peso) de la proteína del ganado vacuno procede de las bacterias; ¡cuando se degusta un bistec de ternera hay que agradecerlo a las bacterias, y cuando se degusta una costilla de cerdo a los vegetales del pienso!

14.2 Xilano

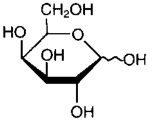
Después de la celulosa el xilano es el hidrato de carbono más extendido cuantitativamente en la naturaleza. El heno y el líber contienen hasta un

30% de xilanos, los residuos que se obtienen al prensar la caña de azúcar (bagazo) el 30%, la madera de conífera del 7 al 12% y los árboles planifolios del 20 al 25%.

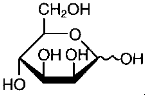
El xilano pertenece a los hidratos de carbono denominados hemicelulosas. No se halla emparentado ni por su composición ni por su estructura con la celulosa, y es al menos parcialmente soluble en agua y en álcalis. Las hemicelulosas están formadas por pentosas (xilosa, arabinosa) o por hexosas (glucosa, manosa, galactosa) así como por ácidos urónicos. Su función en la planta es la de sustancias de reserva o de sostén. Se ha abandonado la denominación de hemicelulosas al descubrirse en los hongos y bacterias una serie de polisacáridos análogos.



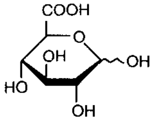
D-glucosa



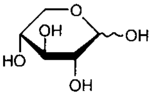
D-galactosa



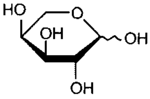
D-manosa



ácido glucurónico



D-xilosa



L-arabinosa

La cadena de xilano está formada por b-D-xilosas unidas por enlaces 1,4-glucosídicos. Se aparta en cuanto a la forma de una cadena de celulosa por la sustitución de los grupos CH_2OH- por átomos H; su grado de polimerización es sin embargo considerablemente inferior (30-100). Los xilanos contienen además arabinosa, glucosa, galactosa y ácido glucurónico. Por tanto, son de estructura compleja y muy ramificados, al contrario que la celulosa.

El xilano es degradado con mayor rapidez y por un número superior de microorganismos que la celulosa y muchos de los microorganismos que degradan la celulosa también producen *xilanasa.* Incluso *Sporocytophaga myxococcoides* que únicamente degrada la celulosa en contacto inmediato con los filamentos de celulosa, y *Neocallimastix*, segregan una *xilanasa.* El tipo de organismos que atacan en primer lugar los xilanos presentes en el suelo depende de los factores ambientales. En los suelos ácidos dominan los hongos, en los suelos neutros y alcalinos dominan los bacilos, *Sporocytophaga* y otras bacterias. En el caso de los hongos la posibilidad de utilizar los xilanos más que una rareza constituye la norma. Es un sustrato extraordinario incluso en el caso de los cultivos de champiñones.

La *xilanasa* es constitutiva en algunas bacterias (como por ejemplo en las especies de *Clostridium*), en cambio en otras tiene que ser inducida por el xilano. Como productos de la acción de la *xilanasa* libre sobre el xilano aparecen, además de la xilosa, xilobiosa y fragmentos de mayor longitud. Parece ser que el enzima ataca simultáneamente distintos puntos de la molécula.

14.3 Almidón y otros glucanos

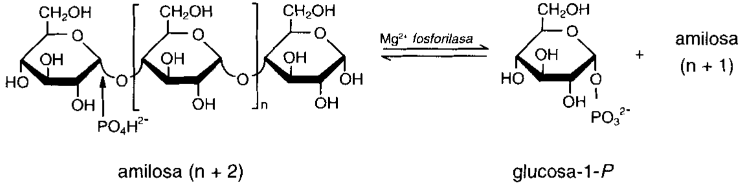
El **almidón** constituye el producto de reserva predominante en las plantas. Se presenta por lo general en forma de gránulos que pueden ser esféricos, lenticulares u ovoides y con una marcada estructura en capas. El almidón vegetal está formado por los dos glucanos **amilosa** (15 a 27%) y **amilopectina**.

La amilosa es soluble en agua caliente y es responsable del color azul típico que adopta el almidón al tratarlo con yodo. Está formada por cadenas no ramificadas de D-glucosa unidas por enlaces glucosídicos α en posición 1,4 y arrolladas en espiral; el grado de polimerización es del orden de 200 a 5000. La amilopectina se esponja al ponerla en agua y al calentarla forma engrudo; al tratar la amilopectina con yodo se obtiene una coloración que va desde el púrpura hasta el marrón. La amilopectina también es una poli-α-1,4-D-glucosa que no obstante está ramificada al igual que el glucógeno en posición 1,6, aunque sólo cada 25 moléculas de glucosa. Presenta además restos de ácido fosfórico e iones calcio y magnesio. Los almidones de distinta procedencia se diferencian en cuanto a su ramificación, su grado de polimerización y por otras características.

Mediante hidrólisis ácida o enzimática del almidón se obtiene glucosa. Se conocen tres tipos de degradación enzimática de los glucanos: 1) fosforolisis, 2) hidrólisis y 3) transglucolización.

Fosforolisis. La transformación del almidón, del glucógeno y de otros polisacáridos análogos hasta glucosa-l-fosfato es catalizada por *α-1,4-glucanofosforilasas (fosforilasas).* Aunque la reacción es reversible sólo participa aparentemente en la **degradación intracelular de los polisacáridos** y no en su síntesis. La fosforolisis comienza a actuar por el extremo libre y no por el reductor de la cadena de amilosa y se libera de este modo una G-l-*P*. La fosforolisis se detiene en los puntos de ramificación 1,6 de la amilopectina y prosigue su acción después de haber actuado la *amilo-1,6-glucosidasa.* Las *fosforilasas* tienen un papel decisivo en la **reuti-**

lización y **movilización** de los polisacáridos almacenados en el interior de la célula (glucanos):



Hidrólisis. En el exterior de la célula los polisacáridos son degradados hidrolíticamente por *amilasas.* La *α-amilasa* se presenta en las plantas, animales y microorganismos. Vuelve rápidamente líquido el almidón, ataca simultáneamente varios enlaces α-1,4 incluso en el interior de la macromolécula (de ahí que se haya denominado también "endoamilasa") y deja además de maltosa oligómeros de 3 a 7 restos de glucosa. Debido a la rápida destrucción de la estructura macromolecular también disminuye con gran rapidez la respuesta a la tinción con yodo y van apareciendo con lentitud azúcares fermentables (glucosa, maltosa, maltotriosa). Si además de la *α-amilasa* también está presente un enzima desramificante como la *pululanasa* o la *isoamilasa*, también son hidrolizadas las α-dextrinas (Fig. 14.3).

Las *β-amilasas* sólo se encuentran en las plantas (cebada, trigo, etc.). Frente a lo que hace la *α-amilasa,* la *β-amilasa* ataca la molécula por el extremo no reductor y separa maltosas. La acción de dicho enzima sobre el almidón da lugar a una rápida sacarización al tiempo que se mantiene la tinción con el yodo. La hidrólisis se detiene cuando se ha degradado aproximadamente la mitad de la amilopectina; el resto que queda es la β-dextrina límite. Si se consigue gracias a la acción de la *amilo-1,6-glucosidasa* la ruptura de las ramificaciones, se produce una degradación total hasta maltosa. La maltosa puede ser degradada hidrolíticamente en el exterior de la célula mediante una *maltasa.* Si existen las *permeasas* correspondientes la maltosa y los oligómeros de bajo peso molecular pasan al interior de la célula y son degradados por fosforolisis.

Transglucolización. SCHARDINGER encontró compuestos cristalinos en medios líquidos que contenían almidón y en los que se había cultivado *Bacillus macerans.* Están formados por cadenas cerradas anulares constituidas por moléculas de glucosa unidas mediante enlaces glucosídicos 1,4. Estas α-, β-, y γ-ciclodextrinas contienen 6, 7 u 8 moléculas de glucosa formando un anillo y se forman a partir del almidón por acción de *transglucosilasas.*

Los **hongos** y **bacterias** producen *α-amilasas.* La capacidad de degradar el almidón mediante exoenzimas amilolíticos está muy extendida en los

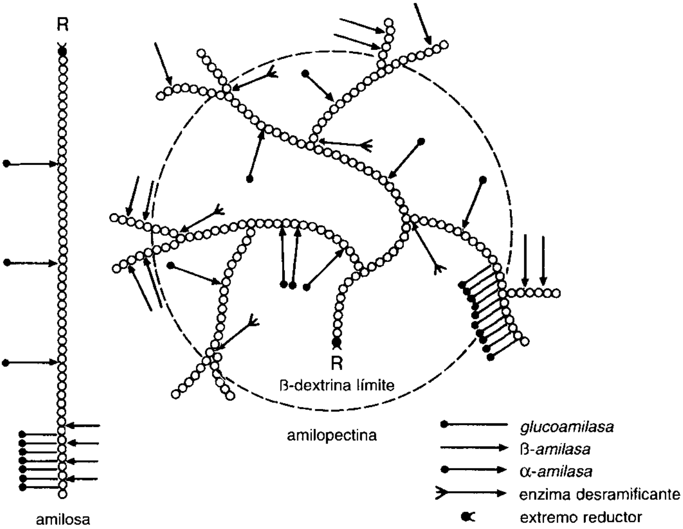


Fig. 14.3 Puntos de ataque de los enzimas implicados en la degradación de la amilosa y la amilopectina (según WINDISH, W.W.; M.S. MHATRE: Adv. appl. Microbiol. 7 [1965] 273).

microorganismos; no se puede hablar de una flora específica que degrade el almidón. Muchos hongos del suelo son productores activos de *amilasas*. Para obtener *amilasas* de grado técnico se utilizan *Aspergillus oryzae*, *Aspergillus niger* y *Aspergillus wentii*. La takamilasa o takadiastasa es, por ejemplo, un producto comercial obtenido a partir de cultivos de *A. oryzae* que degrada el almidón hasta glucosa. Entre las bacterias, los bacilos (*Bacillus macerans, B. polymyxa, B. subtilis*), los pseudomonas y distintos estreptomicetos son productores activos de *α-amilasa*. El enzima segregado por *B. stearothermophilus* soporta incluso una temperatura de 100°C sin perder su actividad. Algunos clostridios termófilos, como *Clostridium thermosulfurogenes* y *C. thermohydrosulfuricum* producen *α-amilasas* y *pululanasas*. Como las levaduras que producen alcohol no segregan *amilasas*, aún continúa dependiéndose para la sacarifización del almidón de las *amilasas* que se encuentran en la malta o bien de *Aspergillus oryzae*.

En los suelos saturados de humedad recién abonados con hidratos de carbono el almidón es degradado en condiciones anaeróbicas preferentemente por los **clostridios sacarolíticos.** Como estos organismos fijan nitrógeno molecular, la degradación anaeróbica de los restos vegetales ricos en polisacáridos puede provocar en el suelo un gran enriquecimiento en nitrógeno.

Otros glucanos. Las bacterias y hongos contienen múltiples glucanos, algunos de los cuales tienen función de sostén y otros de reserva. Muchas de las sustancias mucosas segregadas por los microorganismos tienen que incluirse en los glucanos. Entre los más conocidos se encuentra el **dextrano**, producido en grandes cantidades por ejemplo por *Leuconostoc mesenteroides* o por *L. dextranicum* cultivados en medios de cultivo que contengan sacarosa, por acción del exoenzima *dextranosacarasa* (véase pág. 62).

El esqueleto de la pared celular de las levaduras contiene β-1,6-glucano. Aún se desconoce sin embargo la estructura exacta de este esqueleto insoluble de las células de levadura formado por bloques unidos mediante enlaces β-1,3. La pared celular de las levaduras es degradada al igual que otros muchos glucanos por el jugo digestivo (jugo hepatopancreático) de los caracoles. Esta secreción contiene una mezcla de 30 o más enzimas, entre los que se encuentran la *celulasa, manasa, glucanasa, quitinasa* y *lipasa.* Es adecuado para obtener protoplastos de levadura así como de otros hongos y algas.

El hongo *Aureobasidium (Pullularia) pullulans,* de crecimiento parecido al de las levaduras, segrega un α-1,4-glucano, el **pululano**, cuando crece en medios con glucosa o con sacarosa; este glucano se compone de unidades de maltotriosa unidas por enlaces α-glucosídicos en posición 1,6 (poli-α-1,6-maltotriosa). El pululano es degradado por *pululanasas.*

14.4 Fructanos

En algunas familias vegetales se acumulan fructanos (también denominados polifructosanos) en vez o además del almidón (glucano). Mientras que la inulina, el fructano de las Compuestas, tiene cuantitativamente una importancia relativa, los fructanos del tipo de la fleína merecen un tratamiento más detenido. En los pastos constituyen hasta el 12-15% de la materia seca. A partir de *Aspergillus niger* y de bacterias pudieron aislarse enzimas hidrolíticos, que parecen hallarse muy extendidos.

Los fructanos (también denominados levanos) se presentan como **exopolisacáridos** (apartado 10.7), y los forman una serie de bacterias cuando el medio contiene sacarosa. El proceso de **formación de levanos** es análogo al de la formación de dextranos

$$n \text{ sacarosa} \longrightarrow \text{levano} + n \text{ glucosa}$$

y es catalizado por una *levanosucrasa* extracelular. En medios que contengan sacarosa se hace visible esta producción exoenzimática de levano por la aparición de pequeñas gotas de levano en las cercanías de las colonias, gotas que pueden observarse a menudo en determinadas cepas de *Bacillus subtilis, B. cereus* y *Azotobacter chroococcum. Streptococcus salivarius, S. mutans* y muchas cepas de pseudomonas fluorescentes y de pseudomonas fitopatógenas, de bacilos, *Enterobacter* y otras especies producen levanos. El levano producido por algunas especies es hidrolizado enzimáticamente y utilizado cuando se ha consumido toda la sacarosa.

14.5 Manano

Algunas coníferas contienen manano (hasta un 11% del peso seco). En las células de levadura se presenta en forma de polisacárido soluble y puede extraerse de las suspensiones de levadura por tratamiento con álcalis hidratados o al poner en el autoclave dichas suspensiones. La levadura *Hansenula holstii* segrega cuando crece sobre glucosa un manano soluble esterificado hasta un 20% con ácido fosfórico.

14.6 Pectina

Las pectinas se presentan como compuestos intracelulares en los tejidos de las plantas jóvenes y en especial en las bayas, drupas y pomos. Su importancia radica más en su relación con la estabilidad de las plantas que en su cantidad. Forman parte de la lámina media que se deposita entre las paredes celulares de dos células vegetales vecinas.

Las pectinas son poligalacturónidos. Están formadas por cadenas sin ramificar de ácido D-galacturónico unidos con enlaces glucosídicos α-1,4. Los grupos carboxílicos están esterificados total o parcialmente con metanol. En la degradación microbiana o enzimática de las pectinas participan enzimas pectinolíticos (*esterasas* y *despolimerasas*). Las *pectinesterasas* rompen el enlace metilestérico y liberan metanol. Las *poligalacturonasas* hidrolizan las cadenas de ácido D-galacturónico residuales y liberan monómeros de ácido D-galacturónico. Los ácidos poligalacturónicos se utilizan en forma de sales cálcicas como solidificantes de las gelatinas de frutas.

La capacidad para degradar la pectina es característica de muchos hongos y bacterias. La patogenicidad para las plantas de diversos organismos *(Botrytis cinerea, Fusarium oxysporum, F. lycopersici)* se basa en que segregan enzimas que disuelven la pectina. *Erwinia carotovora* provoca una disolución de los tejidos de la ensalada, zanahorias, apio y análogos. En el suelo es extraordinariamente elevado el número de destructores de la pectina (10^5 células/g de suelo). Los formadores de esporas como *Bacillus macerans* y *Bacillus polymyxa* se encuentran entre los destructores más activos de la pectina. También muchos pseudomonas (*P. fluorescens*), bacterias de la panza, actinomicetos, clostridios termófilos y bacterias del ácido láctico, degradan pectinas. Entre los hongos debemos mencionar *Aspergillus niger*, *Penicillium italicum*, *Aureobasidium pullulans*, *Fusarium* y *Rhizoctonia solani*.

Los destructores o degradadores de la pectina tienen una **importancia técnica** en el enriado del lino y del cáñamo. Este proceso se propone deshacer el enmarañado existente en las fibras de celulosa que constituyen los tejidos vegetales. En el enriado aeróbico por rociado participan hongos, en el enriado anaeróbico sumergido en agua participan principalmente bacterias. Las más importantes de estas últimas parecen ser los productores de pectinasa y con fermentación butílica *Clostridium pectinovorum* y *C. felsineum*. Los enzimas pectolíticos utilizados con fines técnicos, entre otros para aclarar los zumos de frutas, se obtienen principalmente a partir de hongos cultivados en medios de cultivo que contengan pectina.

14.7 Agar

El agar es una mezcla de agarosa y de agaropectina. El polisacárido principal está formado por D-galactosa y por 3,6-anhidrogalactosa unidos alternativamente

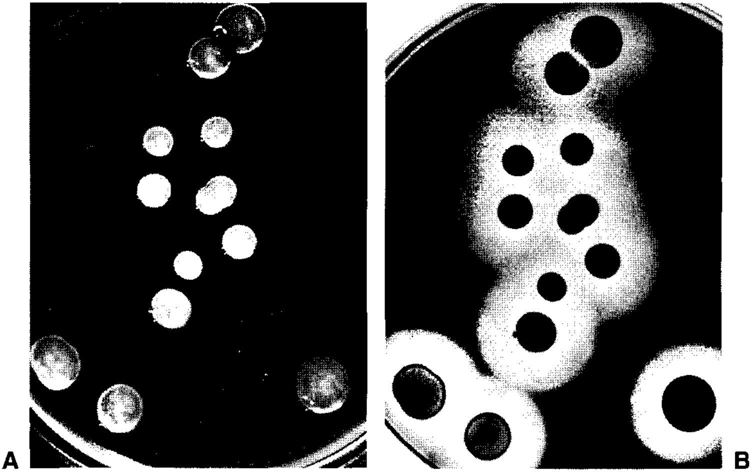


Fig. 14.4 Colonias de *Cytophaga fermentans* var. *agarovorans* sobre placas de agar nutritivo. La degradación del agar se reconoce por el hundimiento de las colonias **A**. Los halos de difusión de los exoenzimas que hidrolizan el agar se han puesto de manifiesto recubriendo la placa con lugol **B** (de VELDKAMP, H.: J. gen. Microbiol. 26 [1961] 331).

mediante enlaces β-1,4 y 1,3. La agaropectina tiene una constitución más complicada y está formada por D-galactosa, 3,6-anhidrogalactosa, los ácidos urónicos correspondientes y por sulfato. La mayor parte de rodofíceas presentan agar; el agar comercial se obtiene a partir de diversas especies de *Gelidium*.

La mayoría de microorganismos no atacan el agar. Tan sólo se han aislado algunas especies bacterianas capaces de hidrolizar el agar, a partir del agua de mar y de algas. La degradación del agar puede verse por la sumersión de las colonias en la capa de agar (Fig. 14.4). Las bacterias que degradan el agar se encuentran principalmente en biótopos marinos; en la zona de mareas se determinaron hasta 10^7 degradadores de agar/g de barro, es decir alrededor del 2 al 4% de las bacterias aeróbicas existentes en dicho lugar. Los géneros *Cytophaga, Flavobacterium, Bacillus, Pseudomonas* y *Alcaligenes* presentan degradadores de agar.

14.8 Quitina

La quitina se diferencia estructuralmente de la celulosa por la sustitución del grupo hidroxilo en el carbono 2 de la glucosa por un grupo amino acetilado (pág. 51). La remarcable estabilidad de la quitina se debe a los puentes de hidrógeno que se forman entre los grupos laterales *N*-acetilo. Es un compuesto de sostén muy extendido tanto en el reino animal como en el vegetal. Constituye el exoesqueleto de muchos invertebrados. En el suelo también se produce constantemente quitina, que es el constituyente principal de la pared celular de muchos hongos en especial de los basidiomicetos y ascomicetos.

No resulta pues sorprendente que buen número de bacterias del suelo y de bacterias acuáticas utilicen la quitina. Entre 50 bacterias degradadoras de la quitina aisladas de tierras de cultivo se hallaban representados los siguientes géneros: *Flavobacterium, Bacillus, Cytophaga, Pseudomonas, Streptomyces, Nocardia* y *Micromonospora;* y entre los hongos, especies de *Aspergillus, Mucor* y de *Mortierella.* En la tierra de cultivo se encuentran hasta 10^6 microorganismos/g capaces de utilizar la quitina. Esta elevada proporción indica que la quitina constituye un sustrato siempre disponible. Al añadir al suelo quitina finamente dividida reaccionan especialmente los actinomicetos multiplicándose con gran rapidez; los medios de cultivo de agar que presenten como única fuente de carbono y de nitrógeno la quitina constituyen medios muy adecuados para seleccionar estreptomicetos. En condiciones anaeróbicas la quitina se degrada por bacterias anaeróbicas estrictas, quitinolíticas altamente especializadas. Es de gran interés profundizar en el conocimiento de la degradación de la quitina, tanto en el intestino de los copépodos como galeras o cangrejos que se alimentan de animales marinos, como en los sedimentos.

El ataque microbiano de la quitina se realiza igualmente por enzimas extracelulares. Los enzimas liberados por *Streptomyces griseus* se dividen en *quitinasa* y *quitobiasa.* La degradación se realiza por un ataque simultáneo de la *quitinasa* en muchos puntos a lo largo del polímero, resultando como producto pequeñas cantidades de *N*-acetilglucosamina y sobre todo quitobiosa y quitotriosa. Estos últimos se rompen en monómeros por la *quitobiasa.*

La quitina puede transformarse también por vía microbiana a quitosano, p. ej. por *Absidia coerulea.* El quitosano es una poliglucosamina formada por desacetilación de la quitina. Se produce biotecnológicamente ya en grandes cantidades y sirve como cola, para cerrar heridas, quelante o aditivo de suelos o alimentos.

14.9 Lignina

La lignina constituye después de la celulosa y de las hemicelulosas el componente cuantitativamente más importante de las plantas. El contenido en lignina del tejido leñoso varía entre el 18 y el 30% del peso seco. La lignina se halla incrustada en el tejido vegetal; se encuentra en las láminas secundarias de la pared celular. La lignina es el producto vegetal masivo que es degradado biológicamente con mayor lentitud. Constituye pues la fuente principal de la materia orgánica del suelo y en especial de los ácidos húmicos, que se va degradando con gran lentitud.

La lignina no es un **compuesto** químicamente unitario sino muy **complicado** (véase Fig. 14.5). Esta complejidad no se debe a la presencia de gran número de monómeros distintos: los componentes básicos son derivados de fenilpropano, especialmente el coniferol. La complejidad se debe mucho más al gran número de enlaces de distinto tipo, con que pueden unirse entre sí los monómeros. Esta estructura tan irregular de la lignina concuerda con la idea de que el proceso enzimático de síntesis de la lignina se halla limitado a la formación de radicales del coniferol. Estos radicales entran a formar parte de manera espontánea de compuestos cuyo tipo y posibilidades es un resultado de la situación mesomérica del radical.

Como compuestos intermediarios de la síntesis de la lignina pueden aislarse una serie de dímeros y de oligómeros del coniferol, tres de los cuales se representan en la figura 14.6. Mientras que la lignina de los abetos consiste preponderantemente en coniferol, la de los árboles de hoja caduca contiene coniferol y sinapinol y la de las gramíneas contiene además cumarol. Las diferencias en cuanto a la composición pueden expresarse principalmente mediante el contenido en grupos metoxi: lignina de los árboles de hoja caduca 20,5 hasta 21,5%, lignina de los abetos 15 hasta 16% y de la las gramíneas 14 hasta 15%.

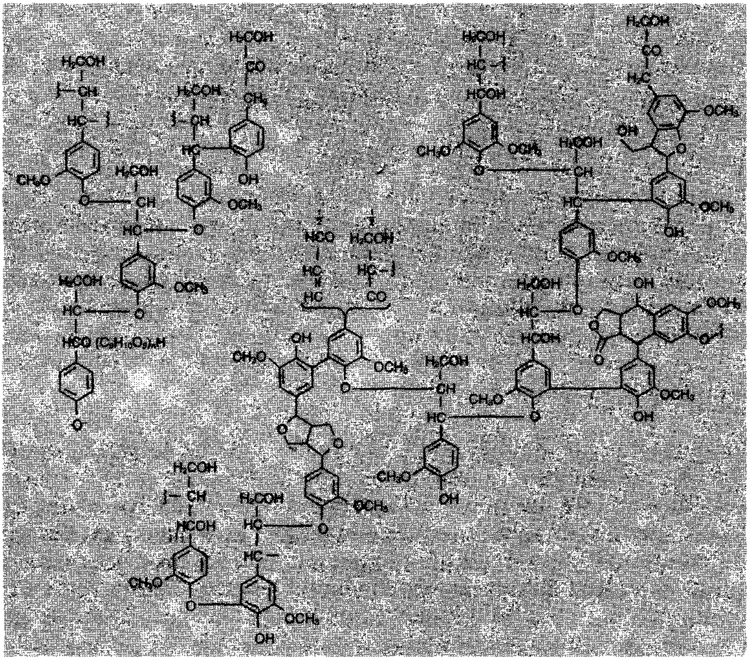


Fig. 14.5 Fragmento de la molécula de lignina de madera de abeto. El dibujo hay que considerarlo como un modelo tridimensional.

Las unidades de fenilpropano de la lignina están enlazadas entre sí formando una red con múltiples formas mediante enlaces éter y C–C. Estos enlaces son extraordinariamente resistentes al ataque enzimático. La lignina de las plantas constituye un producto final inerte del metabolismo que no vuelve a ser introducido en el metabolismo y que sólo ejerce una función mecánica. Únicamente admite la degradación microbiana. Si se compara con la celulosa o con las hemicelulosas la lignina es degradada con una lentitud extraordinaria, tanto por los hongos que destruyen la madera como por los hongos y bacterias del suelo.

Degradación de la lignina. Algunos hongos degradan la lignina incluso en la planta viva. Pueden diferenciarse dos grupos de basidiomicetos destructores de la madera: los causantes de la **"podredumbre parda"** transforman la madera en una masa de color pardo rojizo; destruyen preferentemente los componentes celulósicos y hemicelulósicos de la madera y

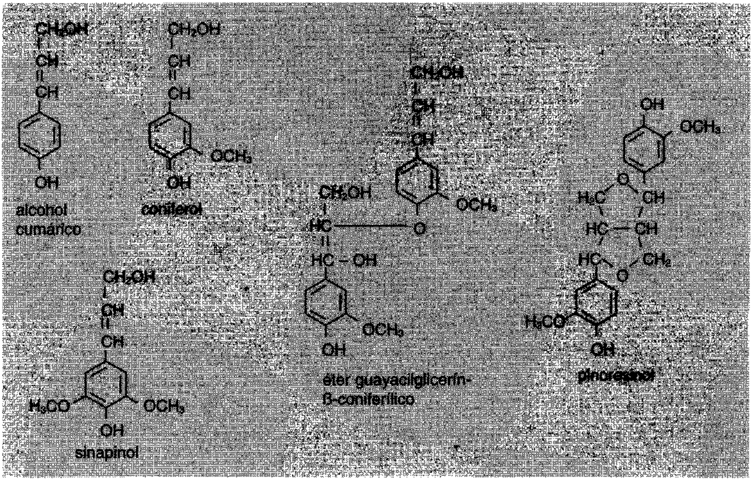


Fig. 14.6 Sustancia de partida en la biosíntesis de la lignina y dímeros del alcohol coniferílico, que aparecen como productos intermedios en la síntesis y la degradación de la lignina.

dejan los polímeros del fenilpropano. Los causantes de la **"podredumbre blanca"** de la madera producen una masa casi blanca; atacan en primer lugar la lignina y no tocan la celulosa. Entre los hongos que atacan primariamente la lignina se encuentran *Polystictus versicolor* y los hongos estratificados (por ejemplo, *Stereum hirsutum*), así como *Phanerochaete chrysosporium*. Otros hongos atacan simultáneamente la lignina y la celulosa: *Pleurotus ostreatus, Ganoderma applanatum, Polyporus adustus, Armillaria mellea.* La degradación de la madera con cultivos puros de hongos es tan lenta que los experimentos correspondientes pueden durar meses e incluso años. Con distintos métodos pudo demostrarse una degradación de la lignina por parte de miembros de otros géneros (*Pholiota, Clitocybe, Lenzites, Panus, Poria, Trametes* y otros).

Uno de los hongos de la podredumbre blanca más activos y que actualmente se ha convertido en un **organismo modelo** para el estudio de la degradación de la lignina por hongos es *Phanerochaete chrysosporium.* La degradación de la lignina se da sólo en presencia de oxígeno y de glucosa. La lignina no se degrada anaeróbicamente. En la degradación está implicado un sistema enzimático, que inicialmente se denominó *ligninasa.* A él pertenecen peroxidasas, de las que dos son hemoproteínas con función peroxidasa, una *lignina-peroxidasa* y otra dependiente del manganeso (*mangano-peroxidasa*) y están bien estudiadas. Las peroxidasas requieren H_2O_2 para su funcionamiento y catalizan la rotura oxidativa de enlaces éter ß-O-4 y enlaces C–C de la lignina y de compuestos modelo. El H_2O_2 procede probablemente de la oxidación de la glucosa (procedente de la celulosa) por la *glucosa-oxidasa.* La formación de las peroxidasas se favorece por deficiencias en nitrógeno. Esta regulación de la formación de las peroxidasas indica que la degradación de la lignina por hongos no se utiliza para la ganancia de energía metabólica a partir de la lignina, sino que en primer lugar va dirigida a la liberación de la madera de compuestos que contengan N, que de otra forma resultan inaccesibles.

Se han hecho investigaciones en torno a las peroxidasas aisladas. Son de interés general, ya que la degradación se inicia por la transferencia de un electrón. Ese electrón genera en el esqueleto de la lignina **cationes de radicales aromáticos** relativamente estables. A su vez éstos actúan de nuevo como oxidantes de un electrón en lugares que pueden estar muy apartados del enzima. De este modo pueden formarse numerosos radicales según el principio de la bola de nieve. Estos radicales son los que conducen a la rotura de los enlaces éter y de uniones C–C, con la consiguiente destrucción de la estructura de la lignina en compuestos fenólicos de bajo peso molecular, que pueden seguirse oxidando por *fenoloxidasas.* La formación intermedia de radicales se conoce bien como resultado de la investigación de la función de *oxigenasas.* Resulta dudoso que pueda llegar a saberse en todos los detalles el mecanismo de la degradación de la lignina, ya que en la destrucción del complejo de la lignina aparecen gran número de compuestos fenólicos. Merece investigarse con más profundidad la formación de radicales intermedios, que también tienen una función en la transferencia de electrones por *oxigenasas.*

No existe ninguna duda de que la lignina no sólo es degradada por hongos sino también por bacterias y por actinomicetos. No obstante, la degradación es tan lenta que al compararla con la restante capacidad metabólica de las bacterias presenta un valor ínfimo y despreciable. Aún se continúa investigando la posible existencia de microorganismos que degraden la lignina o bien que la alteren de tal forma que pueda ser oxidada por otros microorganismos.

14.10 Formación de humus

En el suelo se lleva a cabo la degradación de la mayor parte de la materia vegetal y animal muerta (Fig. 14.7). Los materiales fácilmente degradables son endoxidados de forma rápida y en su mayor parte. Los compuestos menos accesibles a la degradación microbiana permanecen largo tiempo en el suelo en forma de componentes orgánicos. Los componentes

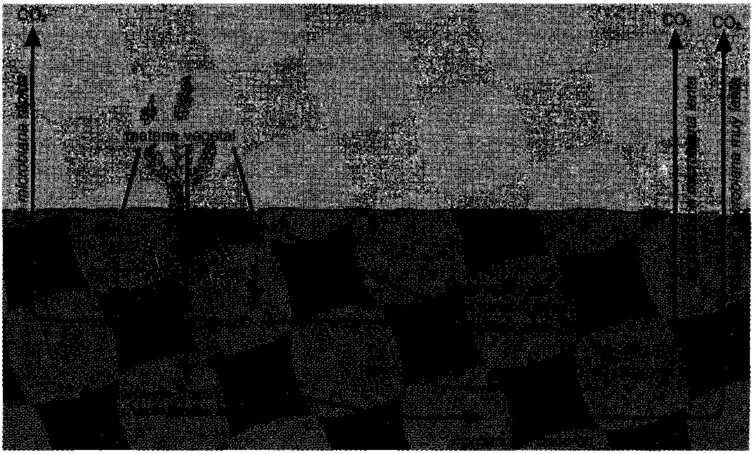


Fig. 14.7 Degradación y transformación de las sustancias vegetales y la formación de humus (según Flaig, W.: Landw. Forschung 21 [1968] 103; modificado).

orgánicos del suelo consisten en parte en los restos vegetales aún no totalmente destruidos, y en parte en **humus.** Se denomina humus a la materia orgánica amorfa existente en el suelo, de color generalmente oscuro, procedente de organismos. Entran a formar parte del humus compuestos difícilmente atacables por los microorganismos, sobre todo la lignina, pero también grasas, ceras, hidratos de carbono y componentes proteicos. Se convierten en polímeros que resultan difíciles de definir químicamente. En la formación del humus no sólo participan bacterias y hongos sino también los protozoos y gusanos inferiores y superiores.

Con la **humificación** de la materia vegetal se produce un enriquecimiento en nitrógeno. Mientras que en los restos vegetales la proporción carbono/nitrógeno es de alrededor de 40:1, en el humus la relación C/N es aproximadamente 10:1. Una gran parte del nitrógeno entra a formar parte de compuestos que no se encontraban en las plantas. La lignina es un componente que contiene mucho nitrógeno y una fuente de lignoproteína y de nitrógeno heterocíclico. El humus presenta en cierta forma un equilibrio dinámico; por una parte se van introduciendo constantemente restos orgánicos y por otra es parcialmente endoxidado. La proporción de humus en el suelo es tanto más elevada cuanto mejores sean las condiciones para su formación y cuanto peores sean las condiciones para la destrucción del mismo. La proporción tan baja de humus de los suelos tropicales se debe a la destrucción tan rápida de la materia orgánica presente en los mismos por los microorganismos favorecidos por el clima tropical. La tierra negra de las estepas se forma en regiones con inviernos largos y rigurosos y con veranos secos. La cantidad de humus que se acumula no sólo depende de las condiciones climáticas y edáficas sino también del tipo de vegetales. La paja de las gramíneas y de las plantas de estepa produce un humus fácilmente degradable mientras que el humus del follaje de los bosques en especial de los de coníferas, es muy difícil de degradar (humus crudo).

Durante la humificación se pierden o bien se forman gran número de grupos carboxílicos en los compuestos orgánicos. Resulta pues de una importancia decisiva para la calidad del humus y para la velocidad de las transformaciones microbianas, la presencia o ausencia de bases. En los suelos minerales o básicos (podzoles, landas, bosques de coníferas) se produce un enriquecimiento en ácidos húmicos pardos (humus ácido). Si existen compuestos minerales en cantidad suficiente, se forman con las bases coloides de humus no saturado que junto con los coloides de arcilla constituyen el llamado complejo de absorción del suelo. El componente orgánico de dicho complejo puede ser considerado como un cambiador de iones de alto peso molecular responsable del equilibrio iónico de los organismos del suelo, de las plantas y de los microorganismos. La formación de un humus suave tiene como consecuencia una activa vida en el suelo; las hifas de los hongos y las sustancias mucosas mantienen unidas las partículas de suelo y determinan de esta forma la deseada estructura suelta del suelo.

Mientras que un suelo mineral es pobre en microorganismos, los suelos ricos en humus presentan una microflora muy rica en especies. Esta microflora presente en el suelo, incluso sin añadirle nada, se denomina **autóctona** en contraposición a los microorganismos **zimógenos** que dominan tras añadir algún producto nutritivo. La acción estabilizadora sobre la dinámica del suelo de la fracción húmica se basa, también en el mantenimiento de una microflora compleja.

14.11 Hidrocarburos

Compuestos químicamente tan estables como las parafinas, el petróleo y el caucho son también degradados por los microorganismos. Únicamente en ausencia de agua, como en los depósitos de petróleo o bien en las condiciones especiales de las minas de carbón, no se produce una degradación digna de ser tenida en cuenta. Son de enorme importancia las preguntas de si, por ejemplo, el crudo de petróleo que va a parar a la tierra o a los lagos es oxidado biológicamente, de si existe una microflora que utilice de forma específica los hidrocarburos y de si de la presencia de gran número de microorganismos que oxidan los hidrocarburos puede extraerse la conclusión de la presencia de petróleo o de gas natural.

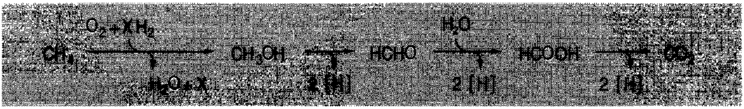
Las bacterias utilizadoras del petróleo están muy extendidas; pueden aislarse de todos los suelos de cultivo, bosques o praderas. Además, la capacidad de utilizar el petróleo como fuente energética no está limitada a unos pocos especialistas entre los microorganismos, sino que se da en numerosos hongos y bacterias. Estos resultados están en concordancia con los nuevos datos analíticos acerca de la composición de bacterias, plantas y animales. Muchos organismos tienen hidrocarburos y son sintetizados continuamente por bacterias y plantas; pertenecen aparentemente a las sustancias céreas, que cubren las hojas de las plantas. No hay que ver a los hidrocarburos tan sólo como reliquias fósiles de la producción primaria de los vegetales en tiempos remotos, sino que forman parte de los metabolitos secundarios que aún hoy día se sintetizan en cantidades considerables por las plantas verdes.

La degradación de los hidrocarburos discurre por lo general tan sólo en **presencia de oxígeno**. Esto es válido para los hidrocarburos alifáticos –desde los gaseosos metano, etano, propano, hasta las parafinas sólidas– y para los hidrocarburos aromáticos –desde el benceno hasta los compuestos policíclicos, pasando por el naftaleno y el antraceno–. Todas estas sustancias pueden conducirse a las vías centrales del metabolismo tras un paso inicial de oxidación. La reacción de oxidación se caracteriza por la incorporación de oxígeno molecular en la molécula orgánica. Se habla de esta reacción inicial como de una **oxigenación** y de los enzimas implicados como de *oxigenasas*. Si sólo se introduce un átomo de O se habla de *mono-oxigenasas*, y de *dioxigenasas* si se incorporan dos átomos de oxígeno del O_2. Estos enzimas se contraponen a las *oxidasas* que transfieren los átomos de H de los dadores de H hasta el oxígeno, reduciendo así el oxígeno hasta agua, pero nunca los transfieren a moléculas orgánicas ni lo incorporan a material celular.

14.11.1 Metano

El metano adquiere entre los hidrocarburos una situación especial. Es utilizado y oxidado por bacterias incapaces de degradar hidratos de carbono de cadena larga. En las bacterias utilizadoras del metano hay que ver menos a una utilización de los hidrocarburos que a un grupo de bacterias especializado en la utilización de compuestos de un solo carbono (C_1). Por ello se incluye a las bacterias utilizadoras del metano junto con todas las demás bacterias (y levaduras) que utilizan el metanol, las aminas metiladas, el dimetiléter, el formaldehído y el formiato, entre los organismos metilotróficos. En los cultivos de enriquecimiento que tienen al metano como única fuente de carbono y energía se desarrollan una serie de bacterias pertenecientes a distintos géneros: *Methylomonas*, *Methylococcus*, *Methylosinus*. Algunos son capaces de crecer solamente con metano, metanol y dimetiléter como sustrato, y son incapaces de utilizar azúcares, ácidos orgánicos u otros alcoholes.

Obtención de energía. Los equivalentes de reducción para la obtención de energía se consiguen en la oxidación del metano a través del metanol, el formaldehído y el formiato hasta anhídrido carbónico. La oxidación del metano a metanol conduce a una incorporación de oxígeno molecular en la molécula según una reacción catalizada por una *metano-oxigenasa.*



Síntesis del material celular. Por lo general la síntesis del material celular tiene lugar a partir del formaldehído, un producto intermediario en la oxidación del metano. Puede realizarse por distintas vías, siendo las más conocidas las del **ciclo de la ribulosamonofosfato de la fijación del formaldehído** y la vía de la serina. En el ciclo de la ribulosamonofosfato se transforma el formaldehído, que aparece como producto intermediario en la oxidación del metano, junto con la ribulosa-5-fosfato mediante una condensación aldólica dando arabinosa-3-hexulosa-6-fosfato, que se transforma posteriormente mediante una reacción catalizada por una *isomerasa* en fructosa-6-fosfato (Fig. 14.8). Esta última pasa a pentosafosfato, lo mismo que en el ciclo de la ribulosabifosfato en la fijación del anhídrido carbónico. Este ciclo no incluye la reacción de la *sedoheptulosa-1,7-bifosfatasa* y por tanto sigue el curso hacia la izquierda en la figura 11.2 (pág. 405).

La **vía de la serina** (Fig. 14.9) se ha elucidado en *Pseudomonas* MA y en *Hyphomicrobium* X. En otros microorganismos deben presentarse probablemente modificaciones de esta vía. Como aceptor del formaldehído actúa la glicina. En los organismos que asimilan compuestos de C_1 a través de este ciclo deberían poderse demostrar la *hidroxipiruvato-reductasa*, la *malato-tioquinasa*, la *malil-CoA-liasa* y la *isocitrato-liasa.*

Las levaduras sólo pueden utilizar el metanol y no el metano. En estas levaduras (*Candida boindinii, Hansenula polymorpha*) la incorporación del metanol en el material celular discurre igualmente a través del formaldehído, aunque a través de otra pentosafosfato, la xilulosa-5-fosfato. En este **ciclo de la xilulosamonofosfato de la fijación del formaldehído** se transforma el formaldehído y la xilulosa-5-fosfato en glicerinaldehído fosfato y dihidroxiacetona mediante una *transcetolasa* especial. La dihidroxiacetona se fosforila mediante una *trioquinasa*, y los dos se incorporan a las vías biosintéticas.

Utilización de metanol. Además de las bacterias utilizadoras del metano hay otras muchas bacterias y algunas levaduras capaces de utilizar el metanol, como p. ej., *Methylobacterium extorquens, Methylomonas clara,*

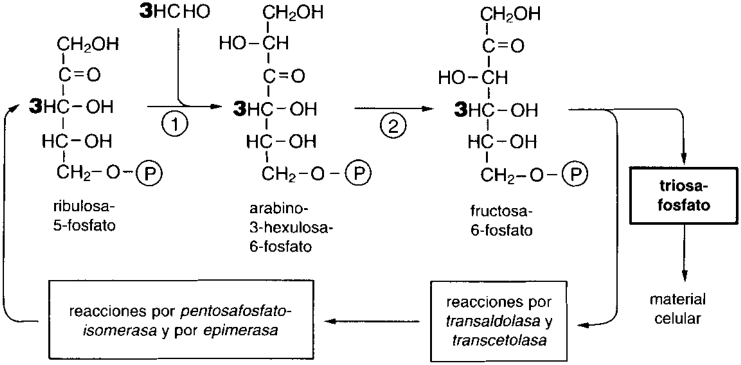

3HCHO
ribulosa-5-fosfato
arabino-3-hexulosa-6-fosfato
fructosa-6-fosfato
triosa-fosfato
material celular
reacciones por *pentosafosfato-isomerasa* y por *epimerasa*
reacciones por *transaldolasa* y *transcetolasa*
①
②

Fig. 14.8 Ciclo de la ribulosamonofosfato de la fijación del formaldehído. Enzimas clave: (1) *Hexulosa-fosfato-sintasa*; (2) *Hexulosa-fosfato-isomerasa* (según Strom, Ferenci y Quayle; Biochem. J. 144 [1974] 465-476).

Xanthobacter autotrophicus, Paracoccus denitrificans, Hyphomicrobium y *Rhodococcus erythropolis,* y entre las levaduras *Hansenula polymorpha* y *Candida boidinii.* Al igual que entre las bacterias metanotrofas, entre las bacterias utilizadoras del metanol también se encuentran bacterias versátiles, que pueden crecer con gran número de sustratos, y otras especies que son utilizadoras del metanol estrictas. Algunas bacterias crecen tan bien sobre metanol que se han empleado industrialmente a gran escala para producir biomasa, para producir proteína de unicelulares.

La utilización del metanol por bacterias se inicia por una *metanol-deshidrogenasa.* El enzima contiene pirroloquinolín-quinona (PQQ) (= metoxantina) como grupo prostético (Fig. 7.2). Se sabe ahora que la PQQ es un componente unido a membranas de muchas *alcohol-deshidrogenasas* y *aminoácido-oxidasas*, y también se encuentra en eucariotas, incluido el hombre.

14.11.2 Etano, propano y butano

Mientras que en los cultivos de enriquecimiento que además de anhídrido carbónico y oxígeno contienen metano se desarrolla preponderantemente *Methylomonas methanica,* en los cultivos con gas natural que presentan un 12% de etano además de metano, sólo aparecen oxidantes de etano. El etano puede ser oxidado por un número muy superior de especies al que puede utilizar el metano. La mayoría de bacterias que oxidan el etano per-

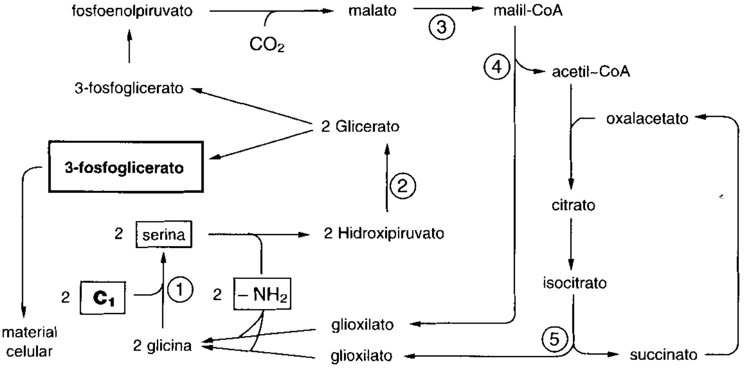

fosfoenolpiruvato
malato
malil-CoA
CO2
③
3-fosfoglicerato
④
acetil-CoA
oxalacetato
2 Glicerato
3-fosfoglicerato
②
citrato
2 serina
2 Hidroxipiruvato
2 C1
①
2 -NH2
isocitrato
material celular
glioxilato
⑤
2 glicina
glioxilato
succinato

Fig. 14.9 La asimilación de compuestos C_1 por la vía de la serina. La molécula C_1 se incorpora a la serina con participación del tetrahidrofolato. Las reacciones siguientes se utilizan para la síntesis de productos intermediarios centrales (fosfoenolpiruvato y piruvato) y finalmente para material celular y para la regeneración de glicina. Enzimas clave implicados: (1) *serina-hidroximetiltransferasa*; (2) *hidroxipiruvato-reductasa*; (3) *malato-tioquinasa*; (4) *malil-CoA-liasa*; (5) *isocitrato-liasa* (según BELLION y HERSCH: Arch. Biochem. Biophys. 153, [1972] 368; ARDER, ATTWOOD y QUAYLE: J. gen. Microbiol. 78, [1973] 155).

tenecen a los géneros *Mycobacterium, Flavobacterium* y *Nocardia.* Algunas de las bacterias que utilizan el etano también son capaces de oxidar hidrógeno gaseoso. En los cultivos de enriquecimiento que presentan propano como dador de hidrógeno se desarrolla un número aún superior de bacterias que en el caso del etano. También se han aislado bacterias capaces de oxidar el butano *(Mycobacterium* y *Pseudomonas).*

14.11.3 Hidrocarburos alifáticos de cadena larga

Estos hidrocarburos (alcanos) pueden ser utilizados por gran número de bacterias. La longitud de la cadena tiene una importancia decisiva. El número de especies capaces de utilizarlos así como la agresividad se incrementa al aumentar la longitud de la cadena parafínica. En dicha degradación participan micobacterias, nocardias y corinebacterias. Durante largo tiempo el crecimiento de bacterias sobre hidrocarburos tuvo el carácter de una curiosidad, después el interés por los microorganismos que oxidan los hidrocarburos se despertó gracias a dos hallazgos. Hacia 1950 en el Instituto de Industrias de la Fermentación de Berlín se aislaron dos levaduras a partir de cultivos de enriquecimiento que contenían una mínima cantidad de hidrocarburos como fuentes de energía: *Candida lipolytica* y *Candida tropicalis. C. lipolytica* ataca todos los homólogos con una cadena de longitud superior a los 15 átomos de carbono. Entretanto se ha visto que la mayoría de especies de *Candida* oxidan los hidrocarburos. La comprobación de cepas procedentes de colecciones de levaduras indica que la capacidad de utilizar hidrocarburos está muy extendida entre las levaduras. La utilización de hidrocarburos se lleva a cabo con un rendimiento extraordinariamente elevado. Utilizando hidratos de carbono como sustrato, el valor Y es de tan sólo 0,5 frente a un valor de 0,7 hasta 1,0 con hidrocarburos.

Mecanismo. Muchos pseudomonas oxidan los hidrocarburos de forma tan completa que no se acumulan productos intermedios. Únicamente *Acinetobacter calcoaceticus* segrega productos de oxidación y las nocardias acumulan intracelularmente dichos productos. El tipo de productos depende del tipo de sustrato. Si *A. calcoaceticus* crece sobre hexadecano, puede aislarse cetilpalmitato de un filtrado del cultivo. El cetilpalmitato es el éster del ácido palmítico y del alcohol cetílico (hexadecanol). Estos dos son productos de oxidación del n-hexadecano. El experimento que se esquematiza a continuación (Fig. 14.10) ofrece una prueba de que la degradación de la parafina se inicia con una oxidación del carbono terminal.

El **oxígeno** participa en el primer ataque de la cadena hidrocarbonada. La oxidación de la parafina no se lleva a cabo si no hay oxígeno molecular. La oxidación es catalizada por una *mono-oxigenasa (alcanoxigenasa):*

$$\text{parafina} + O_2 + NADH_2 \longrightarrow \text{alcohol parafínico} + NAD + H_2O$$

La posterior oxidación de las parafinas se efectúa por **β-oxidación** a través de las reacciones que ya se conocen de la degradación de los ácidos grasos de cadena larga (Fig. 14.11). Si se someten los pseudomonas que oxidan heptano a una presión de oxígeno disminuida se acumulan en el medio ácidos grasos de tres, cinco y siete átomos de carbono. Si se incuban con heptano células que hayan crecido con hexano, se acumula ácido propiónico. La acumulación de ácido propiónico se efectúa probablemente porque las células que han crecido con hexano no presentan los enzimas necesarios para utilizar el propionato por la vía del metilmalonil-CoA.

14.11.4 Hidrocarburos aromáticos

Las plantas producen muchos compuestos orgánicos que contienen anillos aromáticos. El compuesto cuantitativamente predominante es la lignina, que participa en un 20% (peso) en la composición de la madera. Para romper el anillo aromático están capacitadas muchas bacterias y hongos. Algunos pseudomonas crecen con benzoato más rápidamente que con

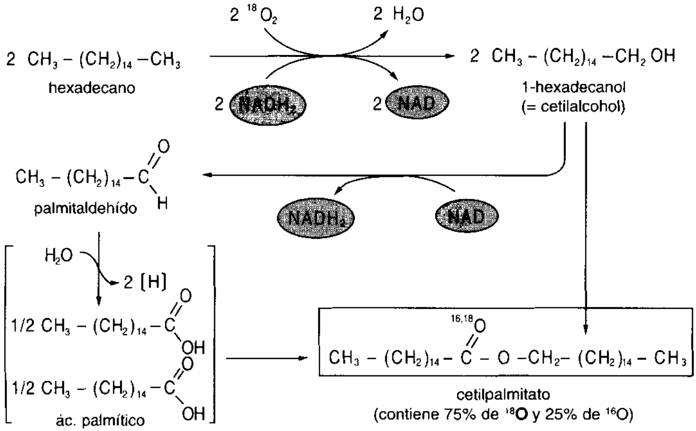

2 ¹⁸O₂
2 H₂O
2 CH₃ - (CH₂)₁₄ -CH₃
hexadecano
2 NADH₂
2 NAD
2 CH₃ - (CH₂)₁₄ -CH₂ OH
1-hexadecanol
(= cetilalcohol)
CH₃ - (CH₂)₁₄-CHO
palmitaldehído
NADH₂
NAD
H₂O
2 [H]
1/2 CH₃ - (CH₂)₁₄-COOH
1/2 CH₃ - (CH₂)₁₄-COOH
ác. palmítico
CH₃ - (CH₂)₁₄- C(=¹⁶,¹⁸O) - O -CH₂- (CH₂)₁₄ - CH₃
cetilpalmitato
(contiene 75% de ¹⁸O y 25% de ¹⁶O)

Fig. 14.10 La formación de cetilpalmitato a partir de hexadecano por *Acinetobacter calcoaceticus.* Durante el crecimiento en agua normal ($H_2{}^{16}O$) en una atmósfera de oxígeno pesado ($^{18}O_2$) se forma cetilpalmitato, cuyo oxígeno consta en un 75% de ^{18}O. Este hecho está de acuerdo con que la oxidación de los alcanos se inicia por una *alcano-oxigenasa* en el carbono terminal.

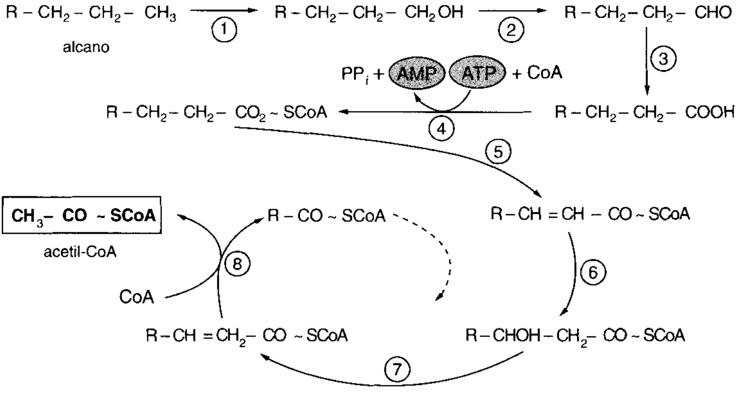
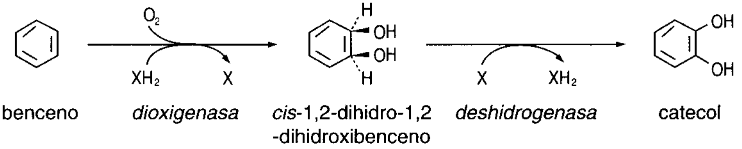

R - CH₂ - CH₂ - CH₃
alcano
①
R - CH₂ - CH₂ - CH₂OH
②
R - CH₂ - CH₂ - CHO
③
R - CH₂ - CH₂ - COOH
PPᵢ + AMP
ATP + CoA
④
R - CH₂ - CH₂ - CO₂ ~ SCoA
⑤
R-CH =CH - CO ~ SCoA
⑥
R-CHOH - CH₂- CO ~ SCoA
⑦
R-CH =CH₂- CO ~ SCoA
⑧
CoA
CH₃- CO ~ SCoA
acetil-CoA
R - CO ~ SCoA

Fig. 14.11 Degradación de alcanos (parafinas) por una oxidación terminal mediante una mono-oxigenasa y por ß-oxidación hasta acetil-CoA. Enzimas implicados: (1) *mono-oxigenasa* (*alcano-1-hidroxilasa*); (2) *alcohol-deshidrogenasa*; (3) *aldehído-deshidrogenasa*; (4) *acil-CoA-sintetasa*; (5) *acil-CoA-deshidrogenasa*; (6) 3-*hidroxiacil-CoA-hidroliasa*; (7) 3-*hidroxiacil-CoA-deshidrogenasa*; (8) β-*cetotiolasa*.

azúcares. Condición necesaria para una rápida degradación de los compuestos aromáticos es la **presencia de oxígeno**. A continuación describiremos las vías degradativas implicadas. Según recientes investigaciones los compuestos aromáticos también se degradan anaeróbicamente, aunque por una vía distinta, que aquí tan sólo señalaremos (pág. 484).

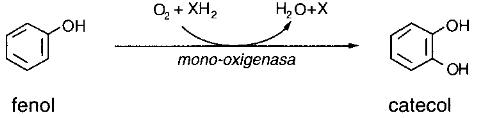
Preparación para la rotura del anillo. La mayoría de los compuestos aromáticos producidos en la naturaleza son degradados en primer lugar por las bacterias a alguno de los dos compuestos siguientes: catecol o protocatecuato. A **catecol** se degradan muchos anillos aromáticos con una sola sustitución o sustituidos en las posiciones 1 y 2, como por ejemplo el mandelato, la fenilalanina, el tolueno, el benzoato, el salicilato, el fenol y el benceno.

A **protocatecuato** se degradan los anillos aromáticos con dos sustituciones en las posiciones 1,3 y 1,4 o bien los que tengan más sustituyentes, p. ej. 4-hidroxibenzoato, quinato, vanillato y shikimato. En todos los casos se introducen grupos hidroxilo en el anillo. El oxígeno procede del oxígeno molecular. La estructura del 1,2-dihidroxibenceno, imprescindible para la rotura del anillo se consigue en los aromáticos no fenólicos por una doble hidroxilación.



El anillo no sustituido del benceno, por ejemplo, se hidroxila mediante una *dioxigenasa* (una doble hidroxilasa) hasta *cis*-1,2-dihidro-1,2-dihidroxibenceno y posteriormente se deshidrata a catecol (se aromatiza).

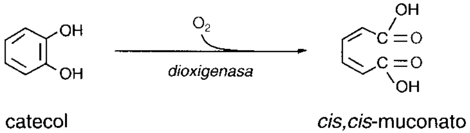
En contraposición, los aromáticos fenólicos se continúan hidroxilando mediante *mono-oxigenasas*. Uno de los átomos de oxígeno del oxígeno molecular se incorpora y el otro se reduce a agua. Como dadores de hidrógenos pueden actuar nucleótidos de piridina.



Los sustituyentes del anillo aromático son eliminados frecuentemente, pero no siempre, antes de la rotura del anillo. Los sustituyentes clorados, los grupos nitro y sulfonato pueden ser sustituidos por grupos hidroxilo. Las cadenas laterales alifáticas pueden modificarse y acortarse de muy diversas maneras, o incluso permanecer intactas.

Rotura del anillo. La rotura del anillo aromático viene determinada por *dioxigenasas*. En ellas se incorpora oxígeno molecular. La rotura tiene lugar o bien entre dos grupos hidroxilo vecinos o entre un átomo de carbono hidroxilado y otro vecino no hidroxilado. Los enzimas mejor estudiados se han aislado de especies de *Pseudomonas*. Los tipos principales de abertura del anillo aromático están representados en la figura 14.12.

Rotura orto. La rotura entre dos átomos de carbono vecinos hidroxilados (rotura *orto* o intradiol) conduce al ácido dicarboxílico. Seguramente tiene lugar primero la adición de una molécula de O_2 en los átomos de carbono vecinos con grupos hidroxilo, con formación de un peróxido cíclico. Por transposición intramolecular se rompe el enlace C-C, formándose entonces *cis,cis*-muconato:

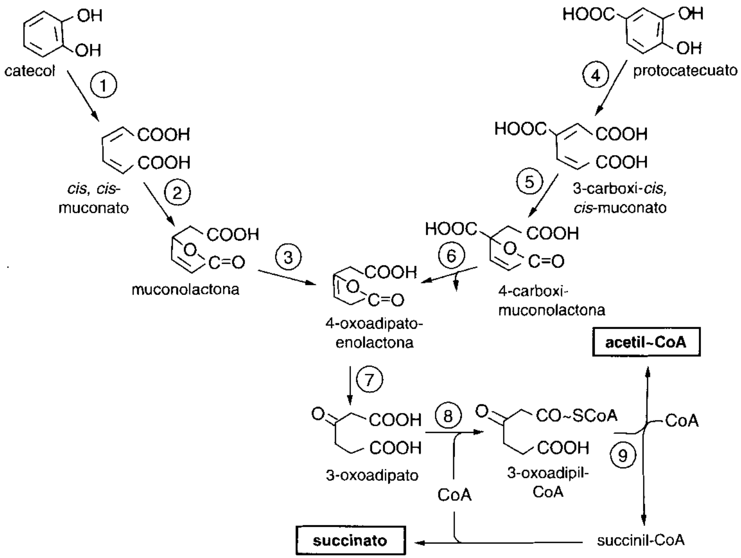


El catecol se rompe por una *orto-pirocatecasa* (*catecol-1,2-dioxigenasa*) y el protocatecuato por la *protocatecuato-3,4-dioxigenasa.* Los productos formados, *cis,cis*-muconato y 3-carboxi-*cis,cis*-muconato se degradan a través del metabolito común 3-oxoadipato. Este último es activado por una *CoA-transferasa* y se escinde en succinil-CoA y acetil-CoA que son transformados a su vez por las vías del metabolismo intermediario (Fig. 14.12).

Rotura meta. La rotura del anillo entre un átomo de carbono hidroxilado y otro no hidroxilado (rotura *meta* o extradiol) está catalizada igualmente por *dioxigenasas.* Como productos de escisión aparecen semialdehídos del 2-hidroximuconato (Fig. 14.13), y luego, según los sustituyentes del ácido alifático así formado se incorpora en el metabolismo intermediario como piruvato, acetaldehído, oxalacetato, fumarato, acetoacetato, succinato u otros productos intermediarios.

Según las investigaciones realizadas hasta el momento las vías de degradación de los compuestos aromáticos se diferencian entre sí extraordinariamente. Varía tanto la preparación de la rotura como la propia rotura en sí. En algunas bacterias incluso las fases de crecimiento o las condiciones del mismo influyen en que se sinteticen los enzimas de la rotura *orto* o de la rotura *meta.* Algunos pseudomonas transforman los compuestos aromáticos procedentes del catecol a través de la vía *orto* y los que van a través del protocatecuato por la vía *meta.*

Vías degradativas convergentes. La degradación de los compuestos aromáticos discurre a través de un número relativamente elevado de reacciones. Las vías convergen en último lugar en la formación de catecol o ácido



catecol
①
cis, cis-muconato
②
muconolactona
③
4-oxoadipato-enolactona
⑦
3-oxoadipato
⑧
CoA
3-oxoadipil-CoA
⑨
CoA
acetil~CoA
succinil-CoA
succinato
protocatecuato
④
3-carboxi-cis, cis-muconato
⑤
4-carboximuconolactona
⑥

Fig. 14.12 Rotura orto del anillo aromático y vía del 3-oxoadipato. Enzimas implicados: (1) *pirocatecasa* (*catecol-1,2-dioxigenasa*); (2) *muconato-cicloisomerasa*; (3) *muconolactona-isomerasa*; (4) *protocatecuato-3,4-dioxigenasa*; (5) 3-*carboximuconato-cicloisomerasa*; (6) 4-*carboximuconolactona-descarboxilasa*; (7) 4-*oxoadipato-enolactona-hidrolasa*; (8) 3-*oxoadipato-succinil-CoA-transferasa*; (9) 3-*oxo-adipil-CoA-tiolasa*.

protocatecoico (Fig. 14.14 y 14.15). Por ello, estas vías de degradación se han utilizado para aclarar la regulación de las vías metabólicas convergentes (pág. 553).

Naftaleno, antraceno y otros aromáticos policíclicos. Algunas bacterias son capaces de degradar hidrocarburos policíclicos, de los cuales citaremos únicamente el naftaleno, el antraceno y el fenantreno. Si se dejan crecer bacterias en un medio de cultivo con estos compuestos, es muy frecuente que se excrete salicilato al medio. Ello es indicativo de que están implicadas las transformaciones indicadas en el ejemplo de los compuestos monocíclicos (Fig. 14.15).

Por último, puede demostrarse que los hidrocarburos naturales son modificados y total o parcialmente oxidados por los microorganismos. Incluso el asfalto, bajo condiciones ambientales apropiadas, es degradado parcialmente, aunque muy lentamente. Incluso el grafito es oxidado en los suelos no estériles.

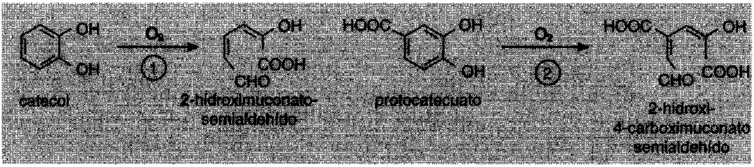

OH
OH
catecol
O_2
①
OH
COOH
CHO
2-hidroximuconato-semialdehído
HOOC
OH
OH
protocatecuato
O_2
②
HOOC
OH
CHO
COOH
2-hidroxi-4-carboximuconato semialdehído

Fig. 14.13 Rotura meta del anillo aromático. Enzimas implicados: (1) *metapirocatecasa* (*catecol-2,3-dioxigenasa*); (2) *protocatecuato-4,5-dioxigenasa*.

Contaminación por petróleo. En la contaminación por petróleo del suelo hay que pensar que los hidrocarburos en los suelos no estériles, aireados, lo degradan rápida y completamente. Sólo cuando la contaminación es muy fuerte y cuando no llega el aire (cuando el petróleo alcanza profundidades importantes en el suelo) existe el peligro de que se conserve y de que tenga lugar una contaminación de las aguas naturales. En los derrames de petróleo en el mar se plantea inicialmente un peligro para la fauna y la flora, pero es igualmente degradado por las bacterias. No obstante, permanecen alcanos de cadena larga, hidrocarburos poliaromáticos y mezclas semejantes al asfalto, que son resistentes durante largo tiempo al ataque biológico.

Degradación anaeróbica de hidrocarburos aromáticos. En base a la participación del oxígeno molecular en los pasos iniciales de la degradación del anillo aromático se asumía que la degradación del anillo aromático, del benceno, ácido benzoico, ácido 4-hidroxibenzoico y muchos deri-

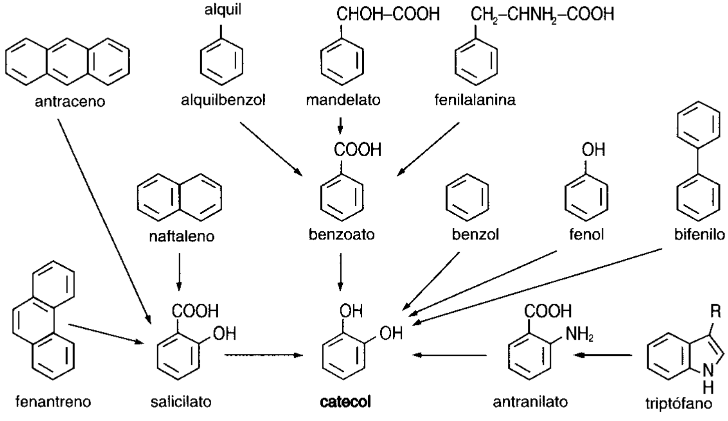

alquil
CHOH-COOH
CH_2-CHNH$_2$-COOH
antraceno
alquilbenzol
mandelato
fenilalanina
COOH
OH
naftaleno
benzoato
benzol
fenol
bifenilo
COOH
OH
OH
OH
COOH
NH$_2$
R
N
H
fenantreno
salicilato
catecol
antranilato
triptófano

Fig. 14.14 Vías degradativas de compuestos aromáticos que conducen a catecol.

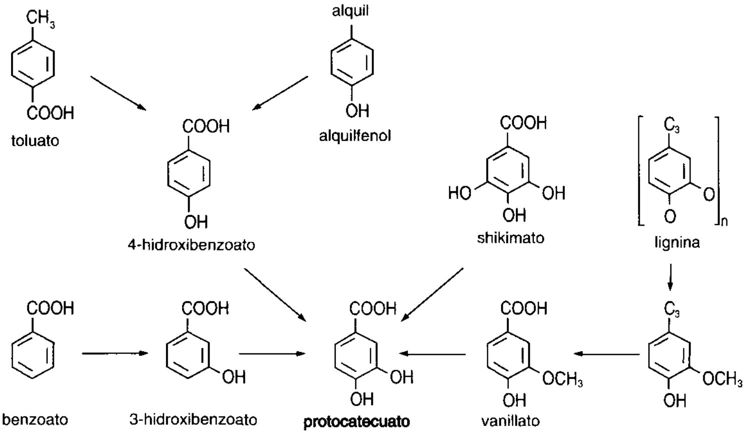


Fig. 14.15 Vías degradativas de compuestos aromáticos que conducen a protocatecuato.

vados no serían degradables bajo condiciones anaeróbicas. Este prejuicio ha tenido que ser revisado. Tanto el fenol como el ácido benzoico y también el benceno, son degradables anaeróbicamente cuando tienen a su disposición en una respiración anaeróbica aceptores de H como el nitrato, el sulfato y el CO_2, o bien mediante la luz. Estos hechos se han comprobado en muestras directas, en cultivos mixtos y en algunos aislamientos bacterianos recientes. No obstante, aún no se dispone de estudios enzimáticos inequívocos de las vías de degradación y de los enzimas implicados. El que *Rhodopseudomonas palustris* pueda enriquecerse en la luz con benzoato como sustrato lo demostraron ya los trabajos de VAN NIEL (1932). Mientras tanto es ya seguro que en la activación inicial del benzoato participa el coenzima A y se forma bencil-CoA. Éste es el producto intermediario que se hidrogena al derivado ciclohexano y finalmente se degrada a acetil-CoA. La degradación anaeróbica de los bencenos sustituidos es una vía reductiva. Aún falta mucho trabajo para aclarar las múltiples posibilidades de la degradación anaeróbica de los anillos aromáticos.

Xenobióticos. Las sustancias antropogénicas o xenobióticos, son sustancias de síntesis química que en su mayoría no son naturales. Es cuestionable el que existan organismos capaces de degradarlas. Los xenobióticos son compuestos empleados para la lucha contra plagas, como fungicidas, herbicidas, insecticidas, nematocidas, etc. Según su estructura química se trata de hidrocarburos sustituidos, fenilcarbonatos, entre otros compuestos. Algunos de los empleados en grandes cantidades en el manejo de plantas y suelos son muy resistentes (recalcitrantes) y prácticamente no se degradan o lo hacen muy lentamente. De otros se sabe que desaparecen del suelo, pero no se sabe cuáles son sus productos de degradación. Otras sustancias están sometidas a una rápida degradación. La investigación en este campo está sometida a grandes sorpresas.

En las capas impermeables arcillosas del suelo bajo fábricas industriales se han almacenado grandes cantidades de disolventes (cloroformo, di- tri- y percloroetileno). El reino terrestre hay que limpiarlo por vía química, física o biotecnológica. La **destoxificación microbiana** se ocupa de problemas relevantes. Los productos de síntesis como el polietileno o el propileno no son perjudiciales, pero aparentemente no son degradables biológicamente. Aunque las sustancias reblandecedoras se vayan oxidando poco a poco, la estructura del polímero se mantiene. Cabe esperar que estos polímeros vayan siendo sustituidos por biopolímeros, como los polihidroxi-ácidos grasos o por derivados del almidón.

Cometabolismo. Algunas sustancias se transforman aparentemente tan sólo conjuntamente con otros sustratos fácilmente utilizables. Esta transformación de un compuesto que por sí solo no permite la reproducción celular, en presencia de otro compuesto utilizable y que permita el crecimiento (cosustrato) se denomina cometabolismo de cooxidación. El cometabolismo se utiliza, por ejemplo, para depurar aguas residuales industriales, que contienen productos de síntesis difícilmente degradables, conjuntamente con aguas residuales de origen urbano en una misma depuradora. En algunos casos se desconoce aún el mecanismo. Una variante natural de este metabolismo puede imaginarse en la degradación de la lignina por *Phanerochaete chrysosporium* (pág. 471). Unida a la lignina se encuentra la celulosa (lignocelulosa). La glucosa formada es la fuente de peróxido de hidrógeno, de radicales hidroxílicos y superóxido, necesarios para iniciar la degradación de la estructura de la lignina. Se puede emplear la formación de radicales por *mono-oxigenasas* incubando los xenobióticos con sustratos que induzcan la formación de *mono-oxigenasas.*

14.12 Proteínas

Los organismos están compuestos predominantemente por proteínas. Para la mayoría de organismos el mejor sustrato es un ser muerto. Las proteínas de los organismos vivos son atacadas y degradadas rápidamente por gran número de hongos y bacterias. Al igual que otras sustancias de elevado peso molecular las proteínas se escinden en varios fragmentos permeables en el exterior de la célula mediante exoenzimas. Las *proteasas* hidrolizan las proteínas hasta polipéptidos, oligopéptidos y aminoácidos. La actividad

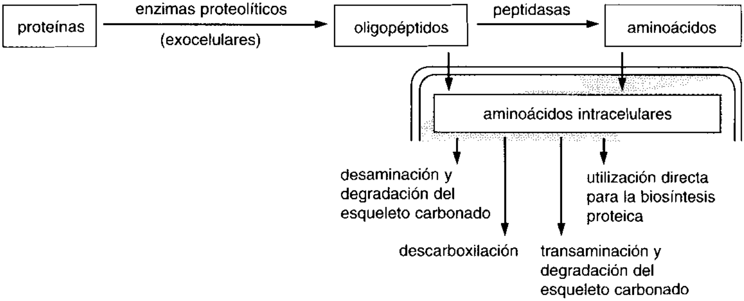

proteínas
enzimas proteolíticos
(exocelulares)
oligopéptidos
peptidasas
aminoácidos
aminoácidos intracelulares
desaminación y degradación del esqueleto carbonado
descarboxilación
transaminación y degradación del esqueleto carbonado
utilización directa para la biosíntesis proteica

Fig. 14.16 Representación esquemática de la degradación de proteínas en el exterior y en el interior de la célula bacteriana y las posibilidades subsecuentes de transformación de los aminoácidos.

proteolítica de los microorganismos se determina frecuentemente sobre un medio de cultivo sólido al que se le añade gelatina. La actividad proteolítica se reconoce porque la colonia queda rodeada por un halo que no precipita con ácidos (HCl). Los oligopéptidos y los aminoácidos son captados por las células mediante sistemas de transporte específicos y son degradados intracelularmente por *proteasas* hasta los aminoácidos; estos últimos son utilizados por la célula o bien para la síntesis proteica o bien son desaminados a través de vías metabólicas específicas e incorporados al metabolismo intermediario y sufren una oxidación terminal (Fig. 14.16).

Las *proteasas* son enzimas que rompen enlaces peptídicos. En primer lugar hay que diferenciar entre proteasas intra y extracelulares. Las primeras cumplen funciones metabólicas, las últimas sirven para la degradación de proteínas extracelulares. Según su especificidad se diferencian *exo-* y *endopeptidasas*. Se designan como *exopeptidasas* a aquellos enzimas cuya especificidad viene determinada por el extremo carboxi o aminoterminal de la cadena polipeptídica. Las *endopeptidasas*, también denominadas *proteinasas*, rompen enlaces peptídicos en el interior de la cadena polipeptídica. Como mínimo se diferencian cuatro grupos: proteinasas de serina, de cisteína, de aspartato y de zinc. Estos enzimas intracelulares son extremamente específicos y desempeñan un gran papel en la regulación del metabolismo, ya que, por ejemplo, rompen péptidos señal y activan o inactivan enzimas por rotura.

Las proteínas semidigeridas se denominan **peptonas**. Esta denominación poco precisa sigue utilizándose para las peptonas de los medios de cultivo bacterianos, obtenidas por tratamiento de proteínas con pepsina y en el que se ha hidrolizado una parte de los enlaces peptídicos. La peptona está compuesta aproximadamente en un 30% (peso) por aminoácidos libres: el resto contiene dipéptidos y tripéptidos, así como polipéptidos solubles no precipitables por el calor o por los ácidos. El medio de cultivo, no definido, caldo nutritivo (**nutrient broth, NB**) tan utilizado, está compuesto por una mezcla de peptona, extracto de carne y extracto de levadura (en la relación 7:7:2), contiene, por tanto, además de aminoácidos y oligopéptidos, toda una serie de azúcares, ácidos orgánicos, vitaminas y oligoelementos.

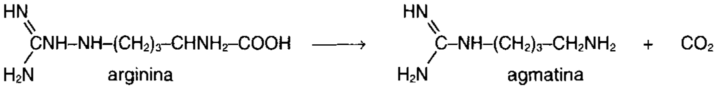
Las **proteasas extracelulares** se liberan al medio y sirven para la degradación de proteínas. Algunas *proteasas* extracelulares actúan como toxinas y factores de virulencia (subtilisina, lisostafina, *estreptoquinasa, elastasa*, hemolisina, entre otras). Las *proteasas* se fabrican industrialmente en grandes cantidades como aditivos de detergentes domésticos, para la elaboración de la piel y para otros fines. Las *proteasas* termoestables se obtienen con la ayuda de bacterias termófilas (Tab. 10.2). Las *proteasas* extracelulares son sintetizadas por gran número de bacterias y hongos, pero en ningún caso por todos los microorganismos.

La **degradación proteica** en los suelos va acompañada de una amonificación. Se habla por ello de una mineralización del nitrógeno o de una **amonificación**. En la degradación de las proteínas participan numerosos hongos y bacterias, entre ellos *Bacillus cereus* var. *mycoides*, pseudomonas, *Proteus vulgaris*, entre otros.

La primera reacción de degradación de un aminoácido puede ser una **descarboxilación** o una **desaminación**. Las *descarboxilasas* se forman preferentemente a pH ácido. Los productos de descarboxilación de los aminoácidos son anhídrido carbónico y aminas primarias (aminas biógenas). Las más conocidas, anteriormente llamadas otomaínas, son la cadaverina, la putrescina y la agmatina; se originan a partir de la lisina, ornitina o arginina. Las aminas primarias aparecen en la descomposición intestinal normal y en otros procesos anaeróbicos de descomposición de los materiales proteicos.

$$\underset{\text{lisina}}{H_2N{-}(CH_2)_4{-}CHNH_2{-}COOH} \longrightarrow \underset{\text{cadaverina}}{H_2N{-}(CH_2)_4{-}CH_2NH_2} + CO_2$$

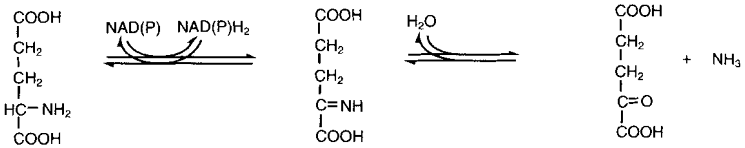
$$\underset{\text{ornitina}}{H_2N{-}(CH_2)_3{-}CHNH_2{-}COOH} \longrightarrow \underset{\text{putrescina}}{H_2N{-}(CH_2)_3{-}CH_2NH_2} + CO_2$$



$$\underset{\text{arginina}}{\overset{HN}{\underset{H_2N}{>}}CNH{-}NH{-}(CH_2)_3{-}CHNH_2{-}COOH} \longrightarrow \underset{\text{agmatina}}{\overset{HN}{\underset{H_2N}{>}}C{-}NH{-}(CH_2)_3{-}CH_2NH_2} + CO_2$$

Por desaminación se entiende la escisión del amonio a partir de un aminoácido. Según lo que suceda con la estructura hidrocarbonada se diferencia entre una desaminación oxidativa, una desaturativa y otra hidrolítica.

La **desaminación oxidativa** es el tipo más extendido de degradación de los aminoácidos. El ácido glutámico se desamina oxidativamente a 2-oxoglutarato a través de la *glutamato-deshidrogenasa*. La reacción es reversible y es también la más importante del metabolismo de los aminoácidos. El equilibrio de la reacción se encuentra claramente del lado del ácido glutámico:



$$\begin{array}{c}COOH\\|\\CH_2\\|\\CH_2\\|\\HC-NH_2\\|\\COOH\end{array}\;\underset{}{\overset{NAD(P)\quad NAD(P)H_2}{\rightleftharpoons}}\;\begin{array}{c}COOH\\|\\CH_2\\|\\CH_2\\|\\C=NH\\|\\COOH\end{array}\;\overset{H_2O}{\rightleftharpoons}\;\begin{array}{c}COOH\\|\\CH_2\\|\\CH_2\\|\\C=O\\|\\COOH\end{array}\;+\;NH_3$$

La **desaminación desaturativa** del ácido asparragínico conduce a fumarato:

$$HOOC-CHNH_2-CH_2-COOH \overset{NH_3}{\rightleftharpoons} HOOC-CH=CH-COOH$$

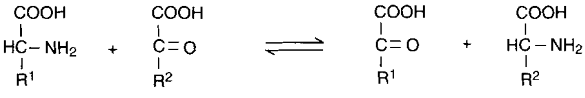
Esta reacción catalizada por la *aspartasa* es también reversible.

Como **desaminación hidrolítica** hay que considerar la hidrólisis de la urea. Un gran número de bacterias son capaces de utilizar la urea como fuente de nitrógeno. La urea se hidroliza a través de la *ureasa:*

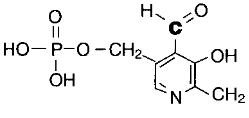
$$H_2N-CO-NH_2 \;+\; H_2O \longrightarrow 2\,NH_3 \;+\; CO_2$$

En la mayoría de las bacterias la formación de *ureasa* está reprimida por los iones amonio. Así se consigue que no se produzca más amonio y que no se excrete al medio de cultivo más que el que es necesario para la síntesis proteica. No obstante, en unas pocas bacterias, los conocidos descomponedores de la urea *Bacillus pasteurii*, *Sporosarcina ureae*, *Proteus vulgaris* entre otros, el enzima *ureasa* es constitutivo; su síntesis no requiere ni la inducción por urea, ni está sometida a una represión por amonio. Las bacterias anteriormente mencionadas transforman en amonio toda la urea disponible (p. ej. en cuadras de caballos), alcanzándose valores de pH (pH 9-10) a los que están adaptadas estas bacterias.

Por **transaminación** se transfiere el grupo amino de un aminoácido a un 2-oxoácido:



$$\begin{array}{c}COOH\\|\\HC-NH_2\\|\\R^1\end{array}\;+\;\begin{array}{c}COOH\\|\\C=O\\|\\R^2\end{array}\;\rightleftharpoons\;\begin{array}{c}COOH\\|\\C=O\\|\\R^1\end{array}\;+\;\begin{array}{c}COOH\\|\\HC-NH_2\\|\\R^2\end{array}$$



piridoxalfosfato

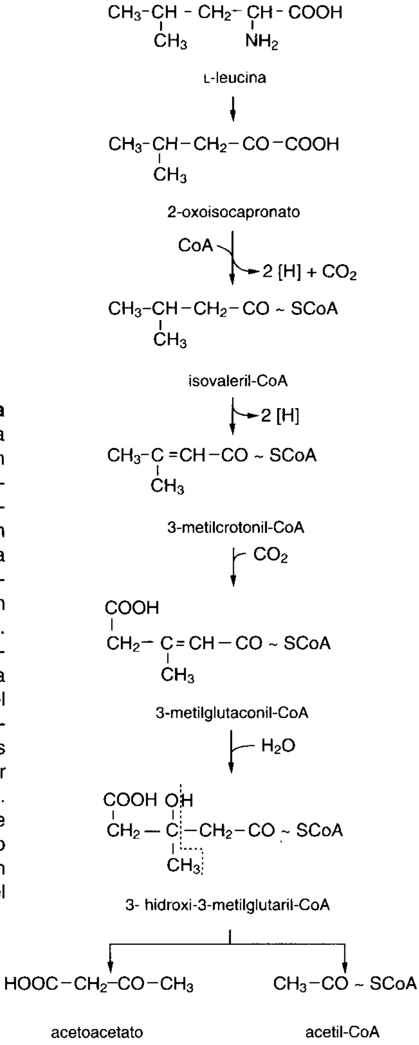

L-leucina
2-oxoisocapronato
CoA
2 [H] + CO2
isovaleril-CoA
2 [H]
3-metilcrotonil-CoA
CO2
3-metilglutaconil-CoA
H2O
3- hidroxi-3-metilglutaril-CoA
acetoacetato
acetil-CoA

Fig. 14.17 Vía degradativa de la leucina. La L-leucina se transforma en primer lugar por transaminación en un 2-oxoácido. Éste se descarboxila oxidativamente formando el derivado del CoA. Una deshidrogenación conduce a 3-metilcrotonil-CoA. Una carboxilación dependiente de la biotina, seguida de una hidroxilación forma 3-hidroxi-3-metilglutaril-CoA. Los productos de escisión aceto-acetato y acetil-CoA se transforman a través de las vías ya conocidas. En el ejemplo de la degradación de la leucina queda claro que las reacciones de carboxilación pueden participar también en procesos degradativos. La disminución en los contenidos de anhídrido carbónico del medio bajo un umbral determinado conduce en muchos microorganismos al cese del crecimiento.

La transaminación se utiliza tanto para la síntesis de aminoácidos, que no pueden aminarse directamente por el amonio, como para la degradación de algunos aminoácidos.

En las reacciones anteriormente indicadas, la descarboxilación y la transaminación, participa el fosfato de piridoxal (véase Fig. 14.17). Este coenzima del metabolismo de los aminoácidos está relacionado con el piridoxal, también conocido como adermina o vitamina B_6. El grupo reactivo del fosfato de piridoxal es el aldehídico; con la participación de este grupo y del grupo amino de un aminoácido se forma la base de SCHIFF. En la transaminación el grupo amino permanece en el fosfato de piridoxal y el esqueleto carbonado del aminoácido se rompe como un 2-oxoácido; el fosfato de piridoxal se regenera de nuevo mediante una reacción con otro oxoácido. En la descarboxilación se libera anhídrido carbónico de la base de SCHIFF.

Lo que puede sucederle al **esqueleto carbonado** es variable según los distintos aminoácidos. Son pocos los productos de desaminación que al mismo tiempo son intermediarios de las vías metabólicas centrales (piruvato, 2-oxoglutarato, oxalacetato). Otros esqueletos carbonados se transfieren al metabolismo intermediario a través de vías degradativas especiales. Excede al marco de esta exposición describir todas las vías degradativas. Como ejemplo representativo se da en la figura 14.17 la degradación de la leucina. Merece una consideración especial el 3-hidroxi-3-metilglutaril-CoA; este compuesto es un producto intermediario importante de la síntesis de los esteroides y de los carotenoides.

15. Constancia, modificación y transferencia de la información genética

Todos los seres vivos se parecen a sus antecesores en la mayoría de las características. El mantenimiento de las características específicas, esto es, la constancia de las características a través de las generaciones, es lo que se denomina **herencia**.

La **genética** se ocupa del estudio de la transmisión de las características y de las leyes de la herencia. A cada característica le corresponde un **gen** como portador de la información. Ya en la genética clásica se localizaron los genes en los núcleos celulares. También pudo establecerse que los genes deben estar ordenados linealmente. Durante mucho tiempo se creyó que la información hereditaria iba ligada al componente proteico del nucleoplasma. Cuando se consiguió una transferencia de un carácter con el DNA (véase transformación) se alcanzó el convencimiento de que los cromosomas, compuestos en todos los organismos por DNA, son el sustrato físico de las características hereditarias.

Primero se demostró en insectos, y luego en microorganismos, que la expresión de las características hereditarias se debe a la acción de los enzimas. En los microorganismos se pudo tomar a los enzimas como una característica bioquímica exactamente definible. La "**hipótesis un gen – un enzima**" indica que un gen contiene la información necesaria para la síntesis de un determinado enzima o, de forma más exacta, que un gen estructural codifica a una cadena polipeptídica determinada. La modificación de un gen por mutación conduce a una pérdida del enzima o a una modificación en sus características, y por tanto, a un carácter modificado. El gen se pone de manifiesto a través de la mutación. La genética se basa en el estudio de las diferencias en los caracteres fundamentados en las formas alternativas (alelos) de un mismo gen. El estudio de los problemas genéticos va ligado por tanto a los mutantes. La cepa bacteriana aislada del ambiente natural se denomina **tipo silvestre** y la cepa derivada por mutación se denomina **mutante**.

Los microorganismos presentan grandes ventajas como objetos para el estudio de los problemas genéticos: pueden estudiarse un gran número de individuos en poco tiempo y en un espacio limitado. Las bacterias penetraron en la investigación genética cuando se superaron unos viejos prejuicios.

15.1 Mutación y mutagénesis

15.1.1 El carácter no direccional de la mutación

El hecho de que los microorganismos también pudieran variar de forma discontinua sus características hereditarias y de que podían mutar se fue implantando poco a poco. Anteriormente al desarrollo de la técnica de los cultivos puros se aceptaba en muchos círculos (NÄGELI, ZOPF) que las bacterias tenían forma y características fisiológicas variables. Se pensó que el gran número de bacterias que pueden encontrarse en los ambientes naturales debían ser el reflejo de distintos estadios del ciclo vital de un pequeño número de especies (**pleomorfismo**). Frente a ellos, COHN y KOCH defendían el **monomorfismo** en base a una serie de métodos mejorados y a los conocimientos adquiridos en sus investigaciones con cultivos puros, según los cuales las bacterias podían diferenciarse y clasificarse en base a sus características morfológicas y fisiológicas estables. Había también que aprender a diferenciar entre el genotipo y el fenotipo en las bacterias. Como **genotipo** se designa el sustrato genético de una célula y frente a él se sitúa su expresión o **fenotipo**. La manifestación del fenotipo depende de las condiciones ambientales para un mismo genotipo.

El término "**mutación**" fue acuñado por DE VRIES debido a sus investigaciones acerca de la variación genética de las plantas, haciendo referencia al "cambio brusco hereditario en los caracteres". BEIJERINCK trasladó este término a las bacterias.

Las **variantes** más significativas entre las bacterias eran aquellas que se habían producido por **influencia de un tóxico**. A estas células resistentes frente a un veneno se las consideró durante mucho tiempo como producto de una adaptación. Resultó difícil diferenciar entre una **adaptación fenotípica** frente a condiciones ambientales modificadas, de una **modificación genotípica**, aunque este criterio sea sencillo. La adaptación fenotípica la realizan todas las células de un cultivo simultáneamente, mientras que una modificación genotípica la realizan siempre tan sólo unas pocas células de un cultivo; como consecuencia de una adaptación al medio, por ejemplo, las células que se han vuelto genotípicamente resistentes frente al tóxico crecen más deprisa que la cepa original y resultan seleccionadas.

Se planteó también la cuestión de si la modificación genotípica se debía al medio de selección y si era orientada en un sentido determinado, o si la mutación era dependiente del medio y no direccional. La teoría expuesta por LAMARCK acerca de la heredabilidad de características adaptativas no podía sostenerse en el caso de los organismos superiores. Habían triunfado las ideas de DARWIN según las cuales los nuevos tipos y especies aparecerían por mutaciones independientes del medio ambiente con una posterior selección de aquellos tipos mejor adaptados. Varios experimentos que levantaron gran expectación demostraron que las mutaciones en las bacterias también eran espontáneas y no direccionales. De estos experimentos clásicos presentaremos aquí tan sólo uno; es fácil de comprender y demuestra la técnica de los calcos actualmente muy practicada en todos los laboratorios.

Selección indirecta de mutantes por transferencia con calcos. El experimento de selección de LEDERBERG (1952) resiste cualquier objeción. En esta experiencia se empleó por primera vez la técnica de los calcos, actualmente muy utilizada. Sobre una superficie de agar con colonias crecidas se aprieta un calco recubierto con terciopelo y de un diámetro algo inferior al de la placa de Petri. Los pelos del terciopelo quedan así cargados de un inóculo. Si se presiona entonces con este calco sobre una placa de agar no inoculada se transferirán todas las colonias y con la misma disposición.

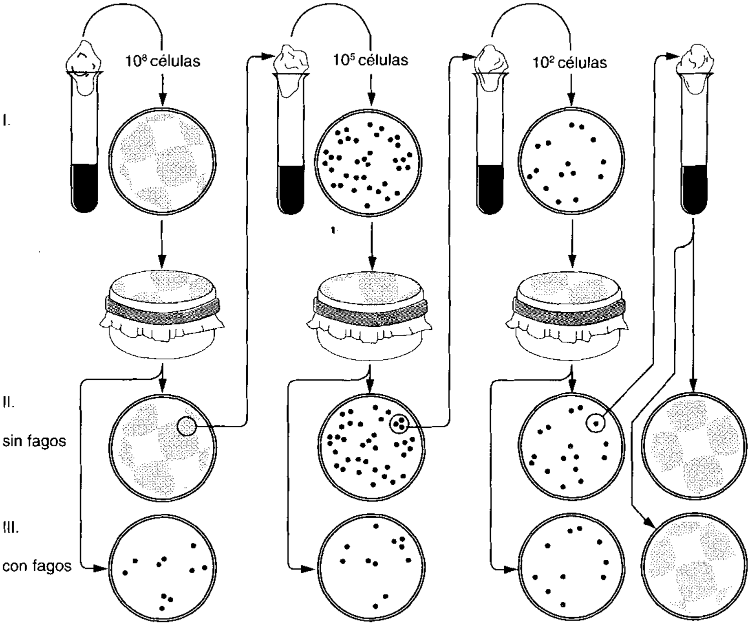


Fig. 15.1 Demostración del carácter no direccional de la mutación en bacterias empleando el método de los calcos ("replica plating"). Aclaraciones en el texto.

A partir de un cultivo confluente de bacterias sensibles a los fagos (placa I, Fig. 15.1) se trasladaron las células con ayuda del calco a placas de agar normales (II) y a placas inoculadas previamente con fagos (III). Después de incubar aparecieron algunas colonias resistentes. Se tomaron las células de la placa normal (II) de una zona que correspondía a la de las colonias resistentes a los fagos de la placa que los contenía. Se dejaron crecer las células y de nuevo se sembraron sobre una placa, se incubaron y se transfirieron a una pareja de placas (normal e inoculada con fagos). El proceso se repitió varias veces; de este modo se consiguió una suspensión de mutantes resistentes al fago que nunca había estado en contacto con él. Este experimento proporciona una demostración irrefutable de que los mutantes resistentes se producen de forma espontánea sin entrar en contacto con el agente selectivo.

15.1.2 Mutaciones espontáneas e inducidas

Mutación espontánea y tasa de mutación. En una población bacteriana aparecen regularmente mutaciones, sin ninguna inferencia experimental; se denominan mutaciones espontáneas y las células implicadas como mutantes espontáneos. La **frecuencia de mutantes** es diferente para cada característica individual, y oscila entre 10^{-4} hasta 10^{-11}. El número de mutantes que se encuentra en una población dada depende de la tasa de mutación, de las condiciones ambientales, de la edad de la suspensión y de otros factores. Se denomina **tasa de mutación** a la probabilidad de que se dé una mutación por célula y por generación. La tasa de mutación es constante para tasas de crecimiento elevadas y se determina generalmente en células que estén creciendo exponencialmente y bajo condiciones óptimas. La tasa de mutación espontánea para un gen determinado se encuentra alrededor de 10^{-5}, para un par de nucleótidos determinados alrededor de 10^{-8}.

Mutaciones silenciosas. De la propia degeneración del código genético resulta claro que no todas las mutaciones que aparezcan de esta forma tengan que expresarse fenotípicamente. Una modificación en la tercera base de un triplete no tendrá consecuencias en muchos casos. Se habla en estos casos de **mutaciones silenciosas.** Pero el intercambio de la primera o la segunda base del triplete tampoco tiene por qué conllevar consecuencias drásticas. A pesar de que las estructuras de orden superior de una proteína (estructura terciaria y cuaternaria) estén determinadas por la estructura primaria (secuencia de aminoácidos), los aminoácidos individuales tienen una importancia variable en cuanto a la estructura de la proteína y con ello de su función. Por ejemplo, la transición AUC → GUC conduciría a la sustitución de una isoleucina por una valina, esto es a la sustitución de un grupo lipófilo por otro. Por el contrario, el cambio de CUU a CCU supondría la modificación de la leucina por la prolina. Esta sustitución tiene como consecuencia la formación de un ángulo en la cadena polipeptídica y puede modificar profundamente las estructuras de orden superior. Resulta por tanto comprensible que en un grupo de mutantes modificados en el mismo gen estructural de un enzima puedan darse muchas gradaciones en cuanto a la actividad enzimática, desde una pérdida de la actividad, prácticamente no detectable, hasta una inactividad total del enzima.

Retromutación o reversión. Por lo que hemos visto hasta ahora, queda claro que los mutantes pueden retromutar a las características de la cepa silvestre. Se diferencia entre: (1) **revertientes**, cuando en el mismo gen la segunda mutación restablece exactamente el mismo genotipo; y (2) cuando se establece que se mantiene la mutación original y la segunda mutación se ha dado fuera del lugar del gen inicial (intra o extragénico) y se reinstaura el fenotipo original. A este segundo grupo pertenecen los **mutantes supresores**. En ellos se suprime indirectamente el defecto original por una nueva mutación. Esto sucede, por ejemplo, por modificación del anticodon del RNA de transferencia (véase pág. 41), que ahora reconoce el codon mutante falso e incorpora al aminoácido correcto en la cadena polipeptídica. Como normalmente existe más de un RNAt para cada aminoácido (véase pág. 41) los mutantes supresores tienen en general un crecimiento más lento frente al tipo silvestre, ya que de vez en cuando se incorpora un aminoácido erróneo.

15.1.3 Tipos de mutaciones

Desde el punto de vista de la estructura molecular pueden diferenciarse tres tipos de mutantes, esto es, las mutaciones puntuales, las deleciones e inserciones, y las mutaciones por desplazamiento del patrón de lectura.

Mutaciones puntuales. Se caracterizan por un intercambio de bases. Si una base púrica (p. ej. adenina) es sustituida por otra base púrica (p. ej. guanina) o bien una pirimidínica (p. ej. timina) es sustituida por otra pirimidínica (p. ej. citosina) se habla de una transición. Por el contrario, si la sustitución de bases tiene como consecuencia la sustitución de una purina por una pirimidina, se habla de una transversión. El producto de una mutación puntual es por lo general la sustitución de un codon "con sentido" por otro de "sentido cambiado" ("missense") y la aparición de un polipéptido con un aminoácido cambiado. También puede suceder que el cambio de bases pase un codon con sentido a otro "sin sentido" ("nonsense") que dé la señal para una terminación temprana de la traducción y una síntesis de una proteína incompleta. Para las mutaciones puntuales es característica una elevada tasa de reversión.

Deleciones e inserciones. Una mutación por deleción conduce a la pérdida de una o varias bases en el DNA. La extensión de la deleción puede ser amplia y abarcar a varios genes. Como consecuencia, una deleción no puede reponerse normalmente por una segunda mutación (reversión). Lo mismo es válido para una mutación por inserción, cuya consecuencia es la inserción de una o varias bases en el gen, con lo que se inactiva su actividad.

Mutaciones por desplazamiento del patrón de lectura. El patrón de lectura de un gen está muy bien definido. En la traducción del RNAm el ribosoma se une en una situación próxima al codon de iniciación AUG en una secuencia de unos 9 pares de bases (caja de Shine-Dalgarno) que es complementaria al extremo 3' del RNAr 16S. La traducción se realiza a partir del codon de iniciación con un patrón continuo de tres bases, y cada uno codifica para un aminoácido.

Las mutaciones por desplazamiento del patrón de lectura (mutación "frame-shift") resultan de la intercalación o la pérdida de bases aisladas, y en este sentido representan un caso excepcional de mutaciones por inserción o deleción (Fig. 15.2). En la mutación por desplazamiento del patrón de lectura se lesiona el marco de lectura de un gen, y según la posición de la mutación la célula forma proteínas no funcionales o con actividad catalítica muy disminuida.

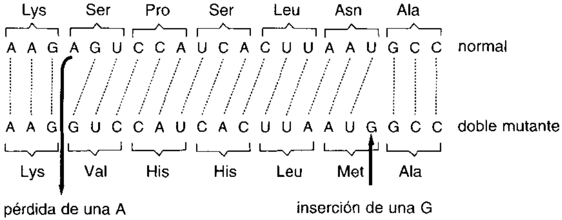
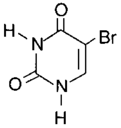
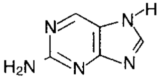
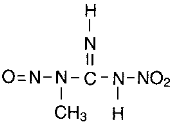
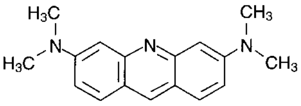

Lys Ser Pro Ser Leu Asn Ala
A A G A G U C C A U C A C U U A A U G C C
normal
A A G G U C C A U C A C U U A A U G G C C
doble mutante
Lys Val His His Leu Met Ala
pérdida de una A
inserción de una G

Fig. 15.2 Desplazamiento en la distribución de los tripletes de la secuencia nucleotídica por una mutación de desplazamiento en la pauta de lectura (mutación "frame-shift"). El bacteriófago T4 es capaz de producir *lisozima*. Este enzima viene codificado por un gen fágico. En la parte superior se da un trozo de la secuencia normal de bases del tipo salvaje con los aminoácidos correspondientes. La fila inferior presenta la secuencia de bases de un fago doble mutante, el cual se ha desviado del tipo salvaje por doble tratamiento con proflavina. Mediante la pérdida de un nucleótido se ha suprimido la primera base (A) del segundo triplete. A partir de dicha posición todos los tripletes están mal leídos; se ha producido un desplazamiento en la parte de lectura. Tras la inserción de una G al final del quinto triplete falso vuelve a leerse con corrección la secuencia de bases del próximo triplete. La secuencia de bases del doble mutante sólo se diferencia pues de la del tipo salvaje por los tripletes segundo al quinto. Si los aminoácidos codificados por dichos tripletes no son esenciales para la función de la proteína, la segunda mutación ha restablecido las propiedades (fenotipo) del tipo salvaje (supresión génica).

Polaridad. Si como consecuencia de una mutación puntual, deleción o inserción, tiene lugar la aparición de un codon de paro (stop) y con ello una interrupción adelantada de la traducción, se provoca una separación del ribosoma del RNAm. Según la extensión del RNAm no traducido los genes siguientes tampoco se traducirán o lo harán muy débilmente de forma gradual. Este efecto se denomina polar. Si la traducción se interrumpe al principio de un gen (extremo 5') se manifiesta con más inten-

Tab. 15.1 Agentes mutagénicos y su modo de acción.

Mutágeno (abreviatura)	Estructura	Acción
5-bromouracilo (BU)		sustitución de la timina por apareamiento con guanina
2-aminopurina (AP)		sustitución de la adenosina por apareamiento con citosina
ácido nítrico	HNO_2	desaminación, enlaces entre cadenas
hidroxilamina	NH_2OH	hidroxilación de citosina
etilmetanosulfonato (EMS)	$CH_2SO_3CH_2CH_3$	alquilación de purinas transiciones
N-metil-*N*'-nitro-*N*-nitroso-guanidina (NMG)	 $O{=}N{-}N(CH_3){-}C({=}N{-}H){-}N(H){-}NO_2$	síntesis de metilguanina durante la replicación transiciones, frecuentemente mutaciones múltiples
anaranjado de acridina		mutaciones de corrimiento del patrón de lectura por intercalación
radiación ultravioleta (UV)	longitud de onda 254 nm	dímeros de pirimidina fallos en la reparación
rayos X	longitud de onda 5 nm	roturas del DNA mono- y bicatenario

sidad sobre la expresión de los genes siguientes, el efecto polar es mayor que si la interrupción se da al final de un gen (extremo 3').

15.1.4 Agentes mutágenos y su acción

Si se tratan las células con agentes mutágenos se incrementa la frecuencia de los sucesos mutacionales. Se habla entonces de una **inducción** de las mutaciones, y de las células así resultantes como mutantes inducidos. Como mutágenos se utilizan agentes químicos, físicos o biológicos (Tab. 15.1). Su modo de acción se pone de manifiesto en los siguientes párrafos con ejemplos escogidos.

Análogos de bases. Los análogos de bases son antimetabolitos. Algunos análogos de bases son tan semejantes a las bases púricas y pirimidínicas normales, que son captados por la célula e incorporados a su DNA. Allí cumplen con la función de las bases normales; no obstante, en comparación con las bases normales tienen una mayor tendencia a unirse en la replicación del DNA a una pareja errónea. Dos antimetabolitos utilizados frecuentemente en la mutagénesis son el bromouracilo (BU) y la 2-aminopurina. El bromouracilo es una molécula análoga estructural de la timina y se incorpora en su lugar en la cadena del DNA, esto es, como pareja de la adenina. El bromouracilo se tautomeriza con más frecuencia a la forma enólica que la timina. En la replicación de una cadena que contenga BU, éste se apareará en su forma enólica con la citosina y conduce entonces a la incorporación de guanina en lugar de adenina. Así se determina que en algunos casos la pareja de bases AT sea sustituida por la CG. La 2-aminopurina se incorpora en lugar de la adenina y tiene una acción semejante. Este tipo de modificaciones que suponen la sustitución de una purina por otro derivado de la purina (A → G) o de una pirimidina por otra (C → T) se denominan transiciones.

Modificación química de las bases. Muchos agentes mutágenos actúan por modificación química de las bases contenidas en el DNA y conducen secundariamente a fallos en la replicación. Una modificación perfectamente determinada es la desencadenada por el **nitrito**. El ácido nítrico desamina la adenina, la guanina o la citosina sin romper o modificar de otra forma a la cadena polinucleotídica. Por sustitución del grupo amino mediante un grupo hidroxilo se transforma la adenina en hipoxantina, se aparea con la citosina en lugar de la timina y conduce así a una transición AT → GC. Si la citosina se desamina a uracilo se apareará con la adenina en lugar de con la guanina y conducirá a una transición GC→ AT. La guanina transformada en xantina sigue apareándose con la citosina. La desaminación de G no da lugar, en consecuencia, a ninguna mutación.

La **hidroxilamina** reacciona preferentemente con la citosina y la modifica de forma que se aparea con la adenina; determina por tanto también transiciones del tipo CG → TA.

Agentes alquilantes. El etil y el metilmetanosulfonato, el dimetil y el dietilsulfato, la etilenimina, las mostazas azufradas y nitrogenadas, así como la *N*-metil-*N'*-nitro-*N*-nitroso-guanidina se cuentan entre los agentes mutágenos más efectivos. Por ejemplo, el etilmetanosulfonato etila preferentemente el átomo N-7 de la guanina. La 7-alquilguanina se escinde de la cadena del DNA, provocándose un hueco en la cadena. En la siguiente replicación se incorporará frecuentemente una base errónea.

Colorantes intercalantes. La proflavina y otros **colorantes de acridina** actúan de otro modo. La molécula de acridina se intercala aparentemente entre bases vecinas de la cadena de DNA e incrementa su separación (**intercalación**). Esta modificación estérica puede expresarse en la replicación del DNA de dos modos distintos. Durante la replicación puede conducir a la pérdida de un nucleótido (deleción) o a la intercalación (inserción) de un par de bases adicional. Este tipo

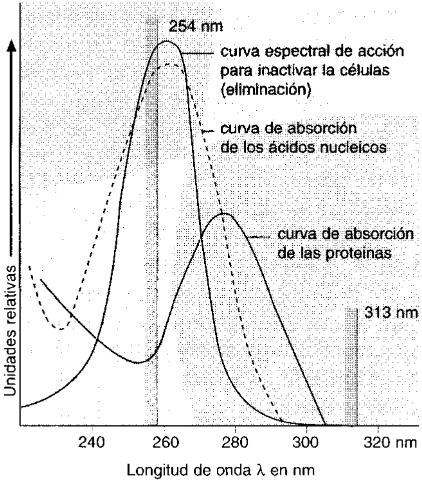


Fig. 15.3 Fundamento de la utilización de lámparas de mercurio de baja presión para la mutagénesis y eliminación de microorganismos. La curva de absorción de los ácidos nucleicos y la curva espectral de acción de inactivación celular tienen un máximo a 260 nm. En esta zona de longitudes de onda la lámpara de Hg tiene una banda amplia de emisión (254 nm). Esta lámpara de HV actúa destruyendo gérmenes (germicida).

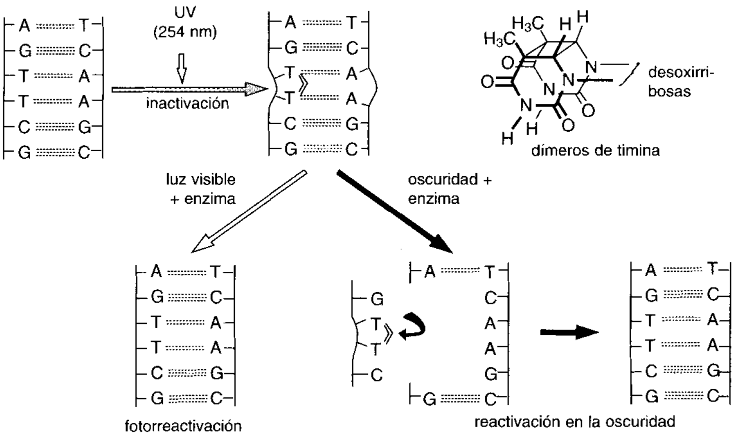


Fig. 15.4 Representación esquemática de la alteración provocada en el DNA por irradiación con ultravioleta y de los procesos de la fotorreactivación y de la reactivación en la oscuridad. Véase texto y apartado 15.1.6.

de mutación tiene consecuencias muy importantes. Conduce a un desplazamiento del patrón o marco de lectura descrito anteriormente (Fig. 15.2).

Luz ultravioleta y radiación ionizante. La luz ultravioleta, los rayos X y otras radiaciones ionizantes tienen una acción letal y una acción mutagénica sobre los microorganismos. No obstante, su acción específica aún está poco aclarada. De la concordancia entre la curva de absorción de los ácidos nucleicos y de la curva de acción a lo largo del espectro en cuanto a la letalidad y a la frecuencia de mutantes, puede concluirse que la radiación UV afecta principalmente a los ácidos nucleicos. El más efectivo es el ultravioleta próximo alrededor de los 260 nm (Fig. 15.3). Los daños son pequeños. La lesión por UV afecta preferentemente a las bases pirimidínicas. Por ejemplo, dos bases de timina vecinas quedan unidas por un enlace covalente. Los dímeros de timina determinan entonces fallos en la replicación (Fig. 15.4).

Transposones. El método de obtener mutaciones con ayuda de transposones va ganando importancia en genética bacteriana como técnica estándar. Los transposones (elementos Tn) son cadenas dobles de DNA cortas, que abarcan más de 2000 pares de bases y por lo general codifican para la resistencia frente a un antibiótico, en casos excepcionales incluso para varios de ellos. Los transposones tienen la propiedad de "**saltar**" en el interior de un genoma, o también entre el cromosoma bacteriano y un plásmido, integrándose en alguno de los muchos lugares del genoma (véase pág. 515). Si un transposón se integra en un gen estructural del cromosoma se interrumpirá la secuencia de nucléotidos del gen, lo que tiene como consecuencia que la información genética del gen estructural no se refleje en un polipéptido funcional. Los transposones se utilizan primariamente para establecer **mutantes por inserción**.

Como los transposones no son capaces de replicarse de forma autónoma, es necesaria una molécula transportadora (vehículo o vector) que lo lleve de una célula bacteriana a otra. Los plásmidos y los bacteriófagos son vehículos apropiados. En este contexto es digno de mención que el colifago Mu ("mutator phage") posee, al igual que un transposón, la posibilidad de integrarse en muchos lugares distintos del cromosoma bacteriano y por tanto de desencadenar mutaciones. Por ello se denominó también al fago Mu como "transposón gigante" y se utiliza de forma rutinaria en la mutagénesis de cepas de *E. coli*.

Mutagénesis dirigida. Los métodos de mutagénesis *in vivo* indicados hasta el momento conducen a mutaciones al azar (mutaciones no dirigidas). Gracias a la técnica del DNA recombinante y a que se dispone de métodos para la determinación de la secuencia del DNA y para sintetizar nucleótidos (apartado 15.5), es actualmente posible generar a nivel molecular, *in vitro*, mutaciones dirigidas en forma de deleciones, inserciones o sustituciones de bases específicas en un determinado lugar de un fragmento de DNA. Un gen mutado de este modo puede introducirse con ayuda de un vector (plásmido o fago) en la célula y se puede analizar el efecto de la mutación. Las herramientas de la mutagénesis *in vitro* se presentan en el apartado 15.5 de Técnica molecular de clonación.

15.1.5 Expresión y selección de determinados fenotipos mutantes

Expresión de la mutación. La expresión de la mutación en el fenotipo va ligada a una serie de procesos que requieren ocasionalmente varias divisiones celulares según los tipos celulares y de mutación. Si en una célula tiene lugar una mutación que represente una ganancia, como por ejemplo la reversión de un mutante **auxótrofo** (que requiere un aminoácido) a la **prototrofia** (recuperación de la capacidad para sintetizarlo), no tendrá lugar ningún retraso en la expresión de la mutación en el fenotipo en condiciones apropiadas. Por el contrario, una mutación que represente una pérdida, como la auxotrofía por un aminoácido, esto es, la incapacidad de

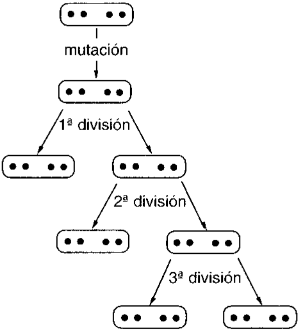


Fig. 15.5 Representación esquemática de la segregación de los núcleos en la multiplicación de una bacteria multinucleada. Hasta la tercera división no aparece un clon genéticamente puro. La expresión de la mutación en el fenotipo puede requerir más generaciones hasta que se dé una "dilución" del material procedente de la célula materna.

sintetizar un aminoácido determinado, no podrá reconocerse hasta transcurrido un período de crecimiento a lo largo de varias generaciones. Este retraso en la expresión de la mutación en el fenotipo se basa en que la mutación determina que sea imposible la nueva síntesis del enzima clave, pero que el enzima aún presente es todavía activo. Tan sólo cuando éste se haya "diluido" suficientemente a lo largo de varias divisiones celulares podrá reconocerse esta característica. En las células con varias copias del cromosoma hay que diferenciar igualmente entre mutaciones por ganancia o pérdida de características. Así, *Escherichia coli* a elevadas tasas de crecimiento en medios ricos contiene en promedio cuatro cromosomas por célula (apartado 2.2.1).

En una mutación por ganancia domina la información del cromosoma mutado; provoca inmediatamente la síntesis del nuevo enzima y la expresión en el fenotipo es inmediata. Si tiene lugar una mutación por pérdida en una célula multinuclear este carácter será recesivo. A lo largo de varias divisiones celulares sucesivas los núcleos se irán distribuyendo en distintos individuos (**segregación nuclear**, Fig. 15.5). Hasta que no aparezca una célula en la que todos los núcleos tengan al gen mutado no empezará a ser efectivo el defecto en esta célula. La descendencia de esta célula representa un clon genéticamente puro.

Selección de mutantes. Los mutantes resistentes frente a antibióticos, inhibidores o bacteriófagos (Tab. 15.2) pueden identificarse fácilmente. El agente añadido para su reconocimiento permite sobrevivir únicamente al mutante resistente e impide el desarrollo de las células silvestres. Existen pocos mutantes que puedan reconocerse directamente sobre los medios de cultivo sólidos habituales debido a modificaciones en la pigmentación, a un crecimiento colonial modificado o a otras características.

Tab. 15.2 Ejemplos para el aislamiento de distintos tipos de mutantes.

Tipo de mutante	Método de selección o enriquecimiento
Mutantes resistentes Frente a inhibidores, antibióticos, tóxicos o bacteriófagos	Siembra en placa de un gran número de células (> 10^8) en medios de cultivo que contienen al agente letal. Los mutantes resistentes, que no captan al inhibidor o lo destoxifican, sobreviven y forman colonias
Mutantes auxotróficos Defectuosos en la síntesis de vitaminas, aminoácidos, ácidos nucleicos u otros constituyentes celulares	Utilización de la técnica de la penicilina para matar las células silvestres; siembra de las células supervivientes sobre medios de cultivo que contienen trazas del metabolito que no pueden sintetizar los mutantes auxótrofos. Los mutantes se reconocen por desarrollar colonias puntiformes. En ausencia del nutriente no pueden crecer (Fig.15.8)
Mutantes catabólicos Defectuosos en un enzima de la degradación del sustrato. Deficiencia en la fuente de carbono o energía	Enriquecimiento por la técnica de la penicilina. Método directo de selección: utilización de medios indicadores (p. ej. eosina-azul de metileno, X-gal, rojo neutro, cristal violeta) en los que por ejemplo los mutantes productores de ácidos provocan un cambio en la coloración. Métodos indirectos de selección: reconocimiento de colonias puntuales (Fig. 15.8)
Mutantes dependientes de la temperatura Se modifica la respuesta frente a la temperatura de la formación o la estructura de una proteína, de modo que resiste temperaturas superiores (resistente a la temperatura) o que manifiesta una sensibilidad frente al calor (sensible a la temperatura)	Enriquecimiento por cultivo a temperaturas que suponen una ventaja para el mutante frente a la cepa silvestre. Utilización de la técnica de la penicilina (si es posible)
Mutantes en la regulación Modificados en la tasa de síntesis de uno o varios enzimas de una vía metabólica	Mutantes, cuya síntesis enzimática ya no está sometida como en la cepa silvestre a la inducción/represión (apartado 16.1.1 y 16.1.2), sino que forman los enzimas catabólicos o biosintéticos de forma constitutiva, pueden enriquecerse por: – cultivo continuo con el sustrato como factor limitante – crecimiento alternativo sobre dos sustratos – crecimiento en presencia de un antimetabolito, que inhibe el crecimiento de las células silvestres

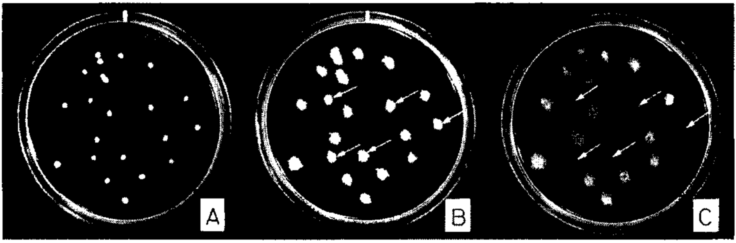


Fig. 15.6 Diferenciación y aislamiento de mutantes bioquímicamente defectivos. Las tres placas de Petri dan el resultado de un experimento para la identificación de mutantes de *Alcaligenes eutrophus* que hayan perdido la capacidad de crecer sobre fructosa (Fruc-). El medio de cultivo de las placas A y B contiene lactato; sobre él crecen las células del tipo silvestre y los mutantes igualmente bien. El medio C contiene únicamente fructosa; sobre él no crecen los mutantes. Después de un enriquecimiento por una técnica de la penicilina modificada se sembró sobre la placa A una mezcla de mutantes y células silvestres (placa de partida, maestra o "master plate"). Una vez las células individuales desarrollaron colonias, se transfirieron a B y C mediante calcos. Las células fructosa negativas se reconocen porque sólo crecen sobre B y no sobre C. La incapacidad de utilizar fructosa se basa en estos mutantes en un defecto en la *2-ceto-3-desoxi-6-fosfogluconato-aldolasa*. Las colonias defectuosas se han marcado con flechas. Para reconocer y aislar mutantes auxótrofos para aminoácidos se sigue el mismo método (Fotos I. SAMMLER).

Otras características modificadas pueden ponerse de manifiesto añadiendo indicadores y colorantes. La identificación de mutantes que se diferencian de las células maternas por tener más o menos requerimientos nutritivos supone la comparación del crecimiento sobre dos medios de cultivo distintos. Si, por ejemplo, un mutante es incapaz de sintetizar el aminoácido leucina, pudiéndolo formar la cepa silvestre materna, únicamente podrá crecer sobre un medio de cultivo al que le hayamos añadido leucina. Se habla entonces de un mutante de tipo **auxótrofo**, mutante que requiere leucina (Leu^-), también llamado mutante por pérdida o por defecto, y en contraposición se denomina a la cepa silvestre como **prototrofa** (Leu^+) con respecto al requerimiento por leucina. Si los mutantes Leu^- se encuentran en una suspensión mezclados con las células salvajes prototrofas podrán diferenciarse ambos tipos comparando el crecimiento sobre dos medios de cultivo distintos. En la figura 15.6 se aclaran los métodos habituales para reconocer a estos mutantes.

Enriquecimiento de mutantes. Tal como se indica en la pág. 496 la tasa de mutación para muchas características es enormemente baja. Para la mayoría de las características metabólicas consideradas hasta el momento se encuentra entre 10^{-10} y 10^{-5}. Si la frecuencia de mutación fuese de

Suspensión de *Escherichia coli*

↓ Inducción de mutaciones

Mezcla de células de tipo silvestre muertas, de células de tipo silvestre vivas y de unas pocas células vivas "premutadas"

↓ Crecimiento en un medio de cultivo (medio completo) en el que tanto crecen las células de tipo silvestre como los mutantes

Expresión de fenotipo de los mutantes

↓ Cultivo en un medio mínimo que contenga penicilina (aproximadamente 100 E/ml)

Eliminación selectiva de las células de tipo silvestre que se hallan en crecimiento

↓ Eliminación de la penicilina (mediante lavado o añadiendo *penicilinasa*), siembra en agar nutritivo rico y formación de colonias

El número de colonias de las células de tipo silvestre supervivientes ha disminuido considerablemente

↓ Transferencia paralela de cada una de las colonias a un medio mínimo completo (siembra por réplica)

Las células de tipo silvestre crecen en ambos medios, mientras que los mutantes auxotróficos sólo crecen en el medio completo. Se inoculan los mutantes.

Fig. 15.7 Método de la penicilina para enriquecer y aislar mutantes auxotróficos de *Escherichia coli* o de otras bacterias que también sean sensibles a la penicilina.

10^{-8} habría que investigar 100 millones de células, o bien entre su descendencia, para encontrar al nuevo mutante. A pesar de que la frecuencia de mutación puede ser bastante superior después de una mutagénesis con agentes mutágenos, el trabajo en la búsqueda de mutantes por pérdida de una característica es aún considerable. Por ello, se realiza primero un **enriquecimiento de mutantes**, anterior a la selección directa.

El enriquecimiento de **mutantes auxótrofos** se basa en el principio de someter la suspensión de células a unas condiciones bajo las cuales no puedan crecer los mutantes buscados, pero si las células prototrofas que pueden ser entonces eliminadas. Esto puede conseguirse mediante agentes que actúen únicamente contra células en crecimiento y que no influyan para nada sobre las células "en reposo" que no estén creciendo. Al eliminarse el agente letal y añadir los factores de crecimiento necesarios podrán desarrollarse las células auxótrofas. Para el enriquecimiento de mutantes auxótrofos de *Escherichia coli* se utiliza la **penicilina** o su derivado, la **ampicilina**. Ésta mata a las células silvestres en crecimiento y permite que sobrevivan las células mutantes en reposo (véase Fig. 15.7).

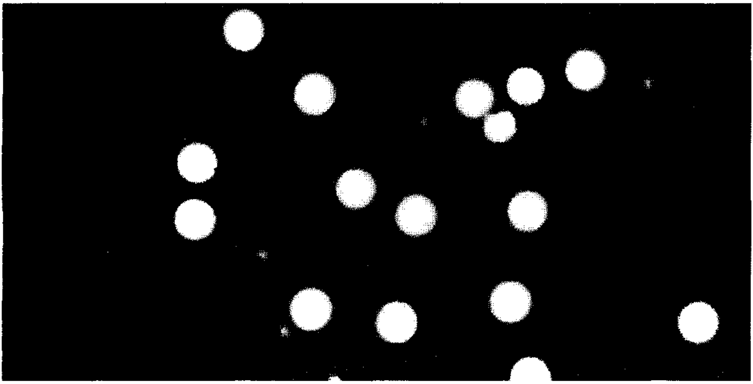


Fig. 15.8 Colonias silvestres (de tamaño normal) y colonias puntuales ("pin-point") de un mutante auxotrófico defectivo de *Escherichia coli*. El medio de cultivo contiene glucosa en exceso (0,4%) y caldo nutritivo ("nutrient broth") en muy baja concentración (0,005%); así se limita el crecimiento del mutante, que requiere una sustancia que contiene el caldo nutritivo.

Después de la mutagénesis y varias horas de crecimiento se incuba la suspensión bacteriana en un medio de cultivo con glucosa y sin nitrógeno, para que las células consuman aquellos compuestos de nitrógeno solubles de los que aún dispongan. Al cabo de varias horas se añade penicilina y sulfato amónico, incubándose de 30 a 90 minutos. Las células maternas prototróficas crecen y mueren por acción de la penicilina; los mutantes auxótrofos para los aminoácidos no crecen y no son lesionados. Se elimina la penicilina de esta suspensión por lavado o por adición de *penicilinasa* y se siembra por último sobre una placa de agar suplementado con los aminoácidos. Entre las células que hayan crecido ahí se encontrará un porcentaje elevado de auxótrofos junto a prototrofos que hayan sobrevivido al tratamiento con penicilina. Con bacterias resistentes frente a la penicilina se pueden utilizar otros antibióticos (novobiocina, cicloserina, colistina, kanamicina). Otros métodos para eliminar selectivamente a las células en crecimiento utilizan las "síntesis letales".

Mediante estos trucos, u otros análogos (p. ej. selección de mutantes "pin-point", de colonias puntuales) (Fig. 15.8), pueden enriquecerse y aislarse distintos tipos de mutantes: mutantes con lesiones en el transporte o en la degradación de sustratos, lesiones en el metabolismo intermediario, sensibles a la temperatura ("letales condicionales"). Acerca de la técnica para el aislamiento de células modificadas en la regulación metabólica insistiremos más adelante. La tabla 15.2 da una visión de conjunto de los métodos utilizados para la selección y el reconocimiento de distintos tipos de mutantes, incluidos los tipos defectuosos en la regulación.

15.1.6 Reparación del DNA

El DNA está sometido permanentemente a la acción de enzimas celulares, que pueden conducir a modificaciones (alquilación, despurinización, fragmentación), y a la de las radiaciones de alta o baja energía (de la luz, de isótopos radioactivos en piedras, edificios o alimentos). La vida se ha desarrollado durante miles de millones de años conjuntamente con las radiaciones. Resultaría por tanto extraño que no se hubiesen establecido mecanismos celulares para reparar las lesiones en el DNA. Por lo general los mecanismos de reparación del DNA son inducibles. Un organismo que haya estado sometido a una dosis subletal de un agente que lesione al DNA, es normalmente más resistente que otro organismo que no se haya tratado. De los numerosos mecanismos conocidos de reparación únicamente mencionaremos tres.

Reactivación oscura y fotorreactivación. En bacterias irradiadas con UV se descubrió que las lesiones provocadas por el DNA son parcialmente reparables. Si se irradia una suspensión bacteriana con una dosis elevada de UV se determinarán lesiones letales (mutaciones letales) en un elevado porcentaje de células; si se establece inmediatamente una incubación en la oscuridad únicamente formarán colonias una fracción baja de células. No obstante, si las células se irradian con luz de longitud de onda más larga (320-550 nm) inmediatamente después del tratamiento con UV sobrevivirá un número mayor en varias potencias de diez. En esta **fotorreactivación** participa un enzima, la llamada *fotoliasa*. Se carga energéticamente por absorción de la luz de longitud de onda larga y la utiliza para romper en monómeros a los dímeros de timina (Fig. 15.4). Así se recupera el estado inicial. Este sistema de reparación es infalible. Existe otro mecanismo de reparación de las lesiones por las radiaciones en las que no participa la luz. La **reactivación oscura** de las células se caracteriza porque se eliminan los fragmentos defectuosos de la cadena de DNA y se sustituyen por nucleótidos nuevos (reparación por escisión). El proceso se cataliza por una endonucleasa correctora, que es un complejo enzimático de los productos génicos *uvrA*, *B* y *C*.

El grado de acción de esta reparación de las lesiones por las radiaciones es de diferente envergadura según las distintas cepas bacterianas. La resistencia frente a las radiaciones de algunas bacterias (por ejemplo de *Micrococcus radiodurans*) se basa en un mecanismo de reparación muy efectivo.

Reparación SOS. Si el DNA se lesiona por dosis elevadas de agentes mutágenos o de radiaciones, o es inhibido en su replicación por antibióticos como la novobiocina y la mitomicina C, entonces la célula dispara una alarma, la respuesta SOS. Tienen lugar modificaciones profundas, entre otras, la liberación de bacteriófagos atenuados (apartado 4.2.2), un retraso en la división celular, una respiración disminuida, un incremento en la degradación de proteínas y, por último, un incremento (inducido) en la síntesis de enzimas de reparación. Desde el punto de vista de la regulación este proceso está dirigido por dos proteínas, LexA y RecA. RecA desempeña normalmente un papel en la recombinación genética, que se discutirá más adelante (apartado 15.2). LexA es una proteína que se une al DNA (proteína represora) que se une a la región del operador e impide la transcripción en RNAm (reprime). LexA actúa, por tanto, como represor de gran número de funciones celulares. En condiciones SOS, que se manifiestan por un incremento en DNA monocatenario, LexA pierde su acción represora, porque la proteína queda sometida a una proteolisis y pierde su capacidad para unirse al DNA. La proteolisis se ve estimulada por la proteína RecA, que según recientes investigaciones no tiene por sí misma una actividad proteolítica. A diferencia del sistema de reparación celular permanente (constitutivo) anteriormente indicado, el sistema inducido en condiciones SOS no es infalible, sino que tiene una elevada tasa de error (error prone-repair). Así aparecen numerosas mutaciones como consecuencia de reparaciones erróneas, p. ej. mutaciones inducidas por radiaciones ultravioletas. Éste es un punto de vista importante cuando se emplean agentes químicos en la terapia contra el cáncer, que impiden por una parte la replicación del DNA e inhiben así la multiplicación celular, pero por otra parte determinan daños importantes por su acción mutagénica.

15.1.7 Prueba o test de mutagenicidad

Prácticamente todas las sustancias que actúan sobre el DNA, cancerígenas, tienen acción mutagénica. El hombre produce anualmente entre 500 y 1000 sustancias nuevas. Es un gran problema, debido al gran número de sustancias, identificar aquellas que tengan una acción cancerígena potencial. Únicamente se podrían determinar con seguridad mediante largos y difíciles experimentos con animales. AMES y colaboradores han desarrollado un procedimiento bacteriano que permite identificar de un modo relativamente rápido las sustancias que inducen modificaciones o lesiones en el DNA y que poseen con cierta probabilidad propiedades cancerígenas. El principio de esta prueba se representa en la figura 15.9.

Para incrementar su fiabilidad y sensibilidad se ha ampliado y modificado el "test de AMES". Se emplean cepas mutantes que tienen mutaciones múltiples, de forma que las bacterias tienen una reacción hipersensible frente a agentes mutágenos, porque no tienen sistemas de reparación del DNA,

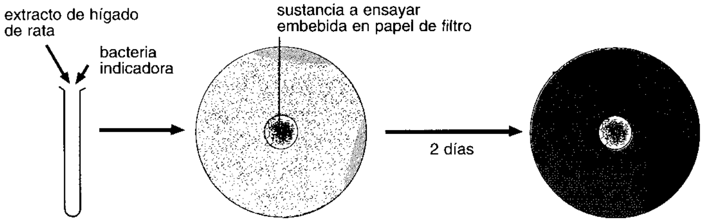

extracto de hígado de rata
bacteria indicadora
sustancia a ensayar embebida en papel de filtro
2 días

Fig. 15.9 Test de Ames para determinar la mutagenicidad de una sustancia. Como bacteria indicadora se utiliza una mutante auxotrófica para la histidina de *Salmonella typhimurium*, que tiene una tasa muy baja de reversión. Las células se mezclan con un extracto de hígado de rata y se siembran sobre una placa de medio mineral sobre la que no pueden crecer. El extracto de hígado tiene la función de transformar metabólicamente a la sustancia ensayada mediante sus enzimas, tal como lo haría el organismo vivo, lo que podría conllevar una conversión hacia la mutagenicidad. Se embebe un papel de filtro con la sustancia a ensayar y se coloca sobre el medio de cultivo. Si la sustancia a ensayar determina mutaciones, también habrá algunas que reinstaurarán en la mutante la síntesis de histidina. Aparecerán colonias de revertientes independientes de la histidina, sobre todo en la zona de difusión del mutágeno.

que normalmente deberían corregir las lesiones. La liberación de un profago de una bacteria lisógena (véase apartado 4.2.2) por una sustancia ensayada, se considera como otra indicación más de su mutagenicidad. Este procedimiento se emplea actualmente como método estándar a nivel mundial, y ha disminuido drásticamente el número de ensayos con animales. La fiabilidad es muy alta: de 100 sustancias cuya mutagenicidad había sido demostrada, 84 dieron positivo en el test con *Salmonella typhimurium* y 91 en el sistema de *Escherichia coli.*

15.2 Transferencia de caracteres y recombinación genética

Durante el proceso de la germinación en los organismos eucarióticos se reúnen en el zigoto dotaciones completas de genes. En este zigoto diploide tiene lugar al cabo de pocas o de muchas divisiones (por mitosis) una recombinación entre las dos dotaciones génicas y también una reducción (por meiosis) hasta una dotación sencilla de genes. Los gamentos son haploides. Esta **nueva combinación sexual** del material genético se opone a los **procesos parasexuales**, entre los que se encuentran también las recombinaciones de los caracteres en los procariotas. Las bacterias son casi siempre haploides; disponen únicamente de una dotación de genes. En ellas también se forman zigotos; pero no son nunca el producto de la unión de células enteras. Por lo general únicamente se transfiere una parte del material genético de una célula dadora a otra receptora, esto es, se forma únicamente un zigoto parcial (merozigoto). El cromosoma del receptor y el fragmento cromosómico del dador se aparean e intercambian segmentos. Durante la división nuclear y celular subsiguiente aparece una célula que contiene únicamente el cromosoma recombinante (Fig. 15.10). Entre las bacterias se conocen tres tipos de transferencia de caracteres: **conjugación, transducción y transformación**.

En el curso de estos tres procesos se transfiere DNA de una bacteria dadora a otra aceptora. Los procesos se diferencian entre sí por el tipo de transporte del DNA. Al proceso de transporte le sigue en la célula receptora la **recombinación del DNA**. En él se incorpora el DNA de la célula dadora en el DNA de la célula aceptora. Se denomina **recombinante** a una célula en la que haya tenido lugar una recombinación.

15.2.1 Recombinación genética

Según el estado actual de la investigación se diferencian dos mecanismos distintos de recombinación entre el DNA extraño que haya llegado a una célula *in vivo* y el cromosoma bacteriano o un plásmido: 1. la recombinación general u homóloga, y 2. la recombinación en un punto o secuencia específica.

Recombinación general u homóloga. La recombinación homóloga indica un mecanismo según el cual el DNA que ha penetrado en una célula se recombina con el DNA celular mediante un apareamiento, rotura e intercambio recíproco de fragmentos de DNA (Fig. 15.10). Condición previa es que los dos DNA recombinantes deben poseer en una amplia zona la misma secuencia de bases, esto es, han de ser homólogos. La identidad de las moléculas de DNA que han de recombinarse puede variar mínimamente, como sucede en el caso de mutaciones. Así, es posible una recombinación homóloga entre DNA de una cepa silvestre y otra mutante. En el proceso catalítico de la recombinación generalizada participan como mínimo 6 enzimas, que también tienen una función en la reparación del DNA (apartado 15.1.6) y/o en la replicación del DNA (apartado 2.2.1). El enzima más importante es la proteína RecA. En la figura 15.10 se muestra una representación simplificada del mecanismo molecular del proceso de recombinación.

Recombinación en un punto o secuencia específicos. A diferencia de la recombinación homóloga, la recombinación en un punto o secuencia específicos requiere para el reconocimiento tan sólo fragmentos homólogos de DNA considerablemente menores. No está catalizada por la proteína

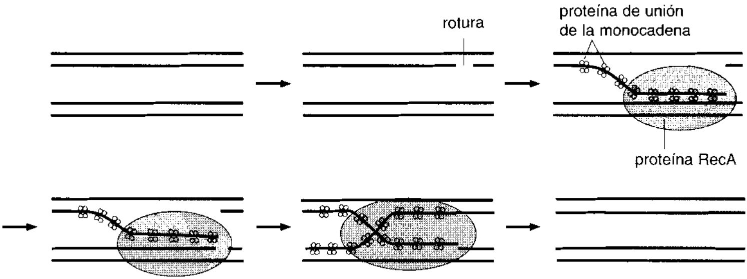


Fig. 15.10 Modelo que representa el mecanismo de las recombinaciones genéticas general u homóloga. El intercambio de un fragmento del DNA procedente de la célula dadora (rojo) por un fragmento del cromosoma de la receptora (negro) se inicia con el apareamiento de los fragmentos homólogos y con un corte en una de las cadenas. En el intercambio de una sola de las cadenas intervienen la proteína RecA y una proteína que capta a la monocadena. La consecuencia de la recombinación es el intercambio de un fragmento monocatenario entre el DNA dador y receptor. El suceso de recombinación se manifestará en la célula hija.

RecA, sino por enzimas que son específicos para cada molécula de DNA que haya de recombinarse. Si los dos DNA llevan una secuencia de reconocimiento, se habla de una recombinación de sitio específico doble ("double site-specific"). Ejemplos de todo ello son la integración del fago lambda (Fig. 15.11) y del plásmido de fertilidad F (Fig. 15.18) en el genoma de *Escherichia coli*. Si solamente una de las dos moléculas de DNA que han de recombinarse lleva la secuencia de reconocimiento, se habla de una recombinación de sitio específico único ("single site-specific"). Ejemplos son los elementos genéticos transponibles (secuencias de inserción, transposones, bacteriófago Mu) que se explicarán a continuación.

Los experimentos genéticos realizados indican que el fago lambda, al pasar al estado de profago, se inserta en un determinado lugar del cromosoma del hospedador, y precisamente entre el operón galactosa y la región biotina (Fig. 15.11). La inserción se inicia por un anclaje.

Anteriormente se pensaba que este anclaje tenía lugar como consecuencia de una elevada homología en las secuencias de bases en esta región, entre las regiones *attP* y *attB*. No obstante, la homología en la secuencia de bases es baja y sólo implica 15 pares de bases que son la región de reconocimiento de una proteína codificada por el fago, que recibe el nombre de *integrasa*. La *integrasa* corta en esta zona al DNA de doble cadena del fago y al del hospedador de un modo semejante a una nucleasa de restricción (apartado 15.4). Se generan en cada DNA dos extremos cohesivos

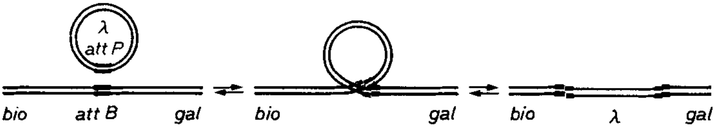


Fig. 15.11 Recombinación en un lugar específico, representada con el ejemplo de la integración del bacteriófago lambda en el cromosoma de la célula hospedadora. Gracias a la acción de una proteína el cromosoma fágico circular se adosa en su región *att P* sobre la región *att B* localizada entre los genes *bio* y *gal*. Por rotura y nueva unión cruzada de las dobles cadenas se integra el fago (véase también Fig. 4.14).

que se vuelven a unir de forma cruzada por la *DNA-ligasa*. La integración del fago es reversible, y en su desintegración participa otro enzima del fago, la *escisionasa*. Ambos procesos, tanto el de la integración del fago como el de su escisión tienen lugar con la actuación de una proteína específica del hospedador, el factor de integración del hospedador (IHF, "integration host factor"). La proteína IHF compuesta por dos productos génicos, de *himA* y de *hip*, está ganando constantemente importancia en las reacciones entre DNA y proteínas.

Secuencias de inserción. Las secuencias de inserción, abreviadamente IS, se cuentan entre los elementos genéticos que pueden integrarse en muchos lugares diversos del cromosoma bacterianos sin una amplia homología de secuencia. Esta capacidad les proporciona una gran movilidad genética, que se denomina **transposición**. Los elementos IS se descubrieron por primera vez como mutágenos en mutantes espontáneos de *Escherichia coli*, ya que por inserción interrumpen la continuidad de un gen (véase el apartado 15.1.3).

Los elementos IS se encuentran en el cromosoma bacteriano, en plásmidos y en bacteriófagos; además se han encontrado en numerosos eucariotas y virus. Están compuestos por 800-1400 pares de nucleótidos, y aparte de las funciones necesarias para la transposición, no parecen llevar otras características fenotípicas. La transposición está catalizada por una *transposasa* codificada por el elemento IS, el cual reconoce una región determinada en la doble cadena de DNA (DNA diana) y la corta de forma asimétrica (véase Fig. 15.12). En los extremos del elemento IS se encuentran pares de nucleótidos repetidos directamente complementarios ("direct repeats") o bien inversamente complementarios ("indirect repeats"), que son importantes para el proceso de la transposición. Si un elemento de inserción encuentra su DNA diana, se da en el lugar de la inserción una duplicación de pares de nucleótidos en el DNA diana. Hay

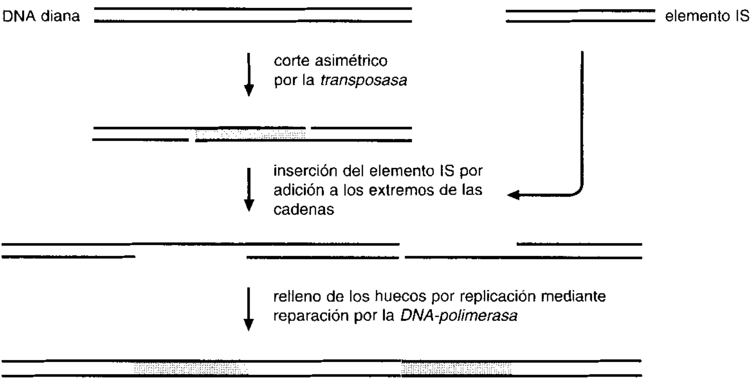

DNA diana
elemento IS
corte asimétrico
por la *transposasa*
inserción del elemento IS por
adición a los extremos de las
cadenas
relleno de los huecos por replicación mediante
reparación por la *DNA-polimerasa*

Fig. 15.12 Modelo que representa la inserción de un elemento IS en un DNA de doble cadena (DNA diana). Véase texto; se indica en gris el DNA que ha de duplicarse (o se ha duplicado) del DNA diana.

que pensar, que los elementos IS tienen un papel importante en la reorientación y nueva combinación de caracteres genéticos.

Transposones. Los transposones, abreviadamente Tn, pertenecen igualmente a los elementos genéticos móviles mutagénicos y se caracterizan también como "genes saltadores". A diferencia de las secuencias de inserción codifican para características fenotípicas fácilmente reconocibles, como resistencias a antibióticos, p. ej. penicilina, tetraciclina y kanamicina, o metales pesados, p. ej. el mercurio. Los determinantes de resistencia de los transposones están flanqueados por dos elementos IS, cuya ordenación puede visualizarse en microscopía electrónica por la formación de heterodúplex (Fig. 15.13). El "salto" o transposición de un transposón no va ligado por lo general a la pérdida del transposón en su punto original de integración, sino que es más bien el resultado de una replicación. Siguiendo un modelo, el transposón se replica entrando en contacto con el DNA diana, de forma que transitoriamente se establece una forma cointegrada entre el vehículo inicial del transposón y del nuevo DNA diana. El cointegrado se disuelve por el enzima *resolvasa*, de modo que finalmente quedan dos moléculas de DNA, cada una de las cuales lleva una copia del transposón.

Bacteriófago Mu. El bacteriófago Mu tiene en común con los elementos IS y los transposones el comportamiento tan poco usual de integración. Mu proviene como abreviatura de "Mutator", porque por integración en los genes del hospedador desencadena mutaciones; actúa como un **trans-**

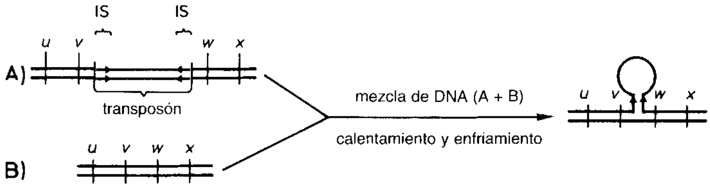


Fig. 15.13 Cómo pueden reconocerse transposones por análisis de heterodúplex mediante microscopia electrónica. Para visualizar el transposón se calienta el DNA de la bacteria silvestre B y de la bacteria A que lleva el transposón, de forma que se separan las cadenas ("funden"). En el lento enfriamiento subsiguiente de la mezcla se establecen apareamientos complementarios entre bases de cadenas sencillas de A con otras de B; se forma un heterodúplex de DNA. Si el transposón tiene "inverted repeats" (secuencias de inserción IS complementarias e inversas) en sus extremos, éstas también se aparean y forman un pedúnculo, sobre el que aparece la parte central del transposón, de una sola cadena formando un lazo (estructura "lollipop" o "chupa chup").

posón gigante. Los retrovirus humanos tienen propiedades semejantes (apartado 4.3). La transposición es un paso imprescindible en el ciclo lítico del bacteriófago Mu, cuyo DNA no puede replicarse fuera del genoma bacteriano. Otra propiedad interesante, que puede demostrarse de forma ejemplar en el fago Mu, es la **inversión génica**. Este proceso, denominado también mecanismo "flip-flop", se basa en una recombinación de punto específico y conlleva la reorientación de un pequeño fragmento de DNA en el genoma del fago. El segmento G del bacteriófago Mu puede tener esta inversión. En él está codificada la síntesis de las proteínas de las fibras de la cola. Si el segmento está en la orientación G^+ se forman las proteínas de la cola S y U, y el fago infecta así a *Escherichia coli* K12 como hospedador. Si el segmento se invierte a la orientación G^- se activa otro promotor y se transcriben en la cadena contraria los genes S' y U'. Estos productos génicos producen unas proteínas de la cola que cambian el espectro de hospedadores del fago. Se puede adsorber entonces células de *Escherichia coli* C y de otras enterobacterias. La inversión genética se ha descrito también en *Salmonella* y ahí es el responsable de una variación en la síntesis de los flagelos.

15.2.2 Transformación

Se denomina transformación a la transferencia de genes por DNA libre, soluble, liberado por una bacteria dadora o que se ha extraído de ella, hasta una bacteria aceptora. Es el tipo de transferencia de caracteres en bacterias conocido desde más antiguo y de mayor valor histórico.

Descubrimiento del DNA como material genético. GRIFFITH descubrió en 1928 la transformación de una cepa de *Streptococcus pneumoniae* (*Pneumococcus*) no capsulada (cepa R) en una cepa S formadora de cápsula (Fig. 15.14). Inyectó ratones con una pequeña cantidad de células R no virulentas y simultáneamente con células S muertas por calor. Las células R provenían de una cepa S (S II) cuya sustancia capsular se diferenciaba serológicamente de la de la cepa S muerta por calor (S III). De los ratones pudieron aislarse cocos virulentos con cápsula del tipo S III. Las células S III habían transferido la característica de la formación de cápsulas a las células R, que por su parte la transferían a su descendencia. Hasta 1944 no descubrieron AVERY, MACLEOD y MCCARTY que el "principio transformante" era DNA. La transformación proporcionó entonces el argumento decisivo para establecer que la información genética se localiza en el DNA y no en las proteínas.

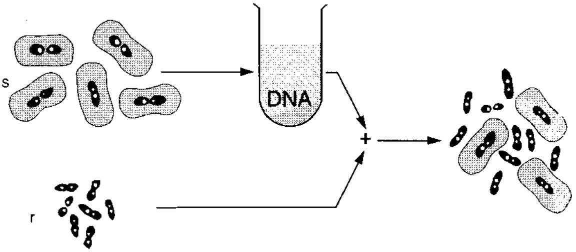


Fig. 15.14 Representación esquemática de la transformación en *Streptococcus pneumoniae*. Transferencia de la capacidad de formación de cápsula por transformación de una cepa no formadora de cápsula (r = forma rugosa) de *S. pneumoniae* a partir de una cepa formadora de cápsula (s = forma lisa, "smooth") de la que se extrae DNA intacto (de NULTSCH, W.: Botánica general. Ediciones Omega, S.A., Barcelona 1975).

Posibilidades de transformación. Para introducir en bacterias DNA aislado existen cuatro posibilidades experimentales: 1. Aprovechar la capacidad de captar DNA (competencia) natural de las diversas especies bacterianas, 2. Inducción de la competencia por un tratamiento de las células, 3. Generar protoplastos, y 4. Electroporación.

1. Se denomina **competencia** a la predisposición natural para captar DNA, y se ha descrito en muchos géneros bacterianos, como *Acinetobacter, Azotobacter, Bacillus, Haemophilus, Mycobacterium, Neisseria, Pseudomonas, Streptococcus* y *Synechococcus*. Se pudieron transferir características como la resistencia a sustancias tóxicas o la prototrofía

a aminoácidos. La competencia depende del estado fisiológico de las células y de la fase de crecimiento. La duración y el momento de la competencia son, no obstante, parámetros específicos de cada especie. Células competentes tienen una superficie celular modificada; su pared celular es porosa, tienen una actividad incrementada de enzimas extracelulares y producen un factor de competencia que se libera al medio, que induce modificaciones características de la competencia. Para la transformación hacen falta concentraciones de DNA muy bajas; son suficientes 0,1 µg DNA/ml de suspensión celular para transformar a las células receptoras competentes, máximo 5% de la población de células. El DNA transformante ha de ser de doble cadena, no debe ser inferior a un determinado tamaño y es cortado por *endonucleasas* en fragmentos de unas 15 kilobases (kb). Durante la captación del DNA se digiere una de las dos cadenas del DNA de doble cadena, de modo que sólo una de las cadenas de DNA penetra en el interior celular. Si hay suficiente homología con el DNA receptor se incorpora al genoma mediante los mecanismos de la recombinación general (apartado 15.2.1).

2. Actualmente se consigue la inducción de la competencia en condiciones de laboratorio por manipulación especial de las células, incluso en aquellas bacterias que no tienen normalmente transformación. Los métodos empíricos utilizados habitualmente comprenden algunas modificaciones de las condiciones de cultivo. Así, *Escherichia coli* puede transformarse con éxito con una eficacia de 0,05 transformantes por célula viable mediante un tratamiento con cloruro cálcico y almacenamiento en frío. Es especialmente de gran importancia para la utilización de esta bacteria en las técnicas de clonación molecular (apartado 15.5).

3. La utilización de **protoplastos** se ha utilizado con éxito para la transformación de bacterias Gram positivas de los géneros *Bacillus* y *Streptomyces*. En estas bacterias se ha utilizado la captación de DNA plasmídico inducida por polietilenglicol (apartado 15.3) por protoplastos sin pared, o bien la fusión de protoplastos sin pared celular para transferir DNA cromosómico. Los protoplastos fusionados, que reúnen partes del genoma de ambas células parentales, pueden regenerarse a formas celulares intactas bajo condiciones experimentales determinadas. Los recombinantes que surgen de una fusión de este tipo llevan características de las células parentales como consecuencia de procesos de recombinación.

4. Las dificultades experimentales y los bajos rendimientos obtenidos al trasladar los protocolos experimentales de transformación a otras cepas, ha conducido en los últimos tiempos al desarrollo de un método muy prometedor, que se conoce como **electroporación**. El método se empleó por primera vez con eucariotas, en la hibridación de células vegetales, y consiste en permeabilizar y fusionar las membranas biológicas mediante un campo eléctrico. Entretanto, se ha conseguido transformar con DNA plas-

mídico un gran número de bacterias Gram positivas y Gram negativas mediante aparatos que se pueden obtener comercialmente.

15.2.3 Transducción

Se denomina transducción a la transferencia de DNA a partir de una célula dadora a otra aceptora mediante bacteriófagos. Por lo general se transfiere únicamente un pequeño fragmento del DNA del hospedador. Pueden diferenciarse dos tipos de **transducción**: una **inespecífica** (generalizada) en la que puede transferirse un fragmento cualquiera del DNA del hospedador, y una **transducción específica** que permite tan sólo la transferencia de unos fragmentos determinados de DNA. En la transducción inespecífica se incorpora el DNA hospedador en lugar, o además, del genoma del fago, mientras que en la transducción específica se sustituyen algunos genes fágicos por genes del hospedador. En ambos casos se trata de fagos transductores que por lo general son defectuosos, p. ej. pierden frecuentemente la capacidad de lisar a la célula receptora. Las características de la transferencia por transducción se han demostrado en un gran número de bacterias, entre ellas especies de *Salmonella*, *Escherichia*, *Shigella*, *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Staphylococcus*, *Vibrio* y *Rhizobium*. No obstante, no todos los fagos son transductores ni todas las bacterias son transducibles.

Transducción inespecífica. La transferencia de genes bacterianos por fagos la descubrieron LEDERBERG y ZINDER en *Salmonella typhimurium* en 1951. En el experimento decisivo (Fig. 15.15) se infectó a la cepa dadora B^+ con el fago atenuado P22. Una vez lisadas las células hospedadoras se

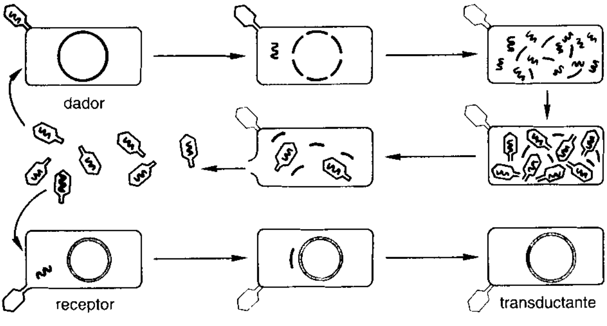


Fig. 15.15 Transducción inespecífica, un mecanismo de transferencia de DNA del hospedador a una bacteria receptora.

separaron los fagos liberados y se incubaron conjuntamente con la cepa aceptora B^-, que se diferencia de la cepa B^+ por lo menos en una característica genética. Los autores encontraron recombinantes con las características de la cepa dadora B^+ cuando sembraron sobre placas con el medio de cultivo selectivo apropiado.

Los procesos que tienen lugar durante esta transferencia inespecífica de DNA son bastante complejos. Durante la multiplicación lítica del fago P22 en la cepa dadora B^+ puede suceder que fragmentos del DNA del hospedador queden incluidos en cápsidos en lugar del DNA fágico. Un lisado fágico contiene, por tanto, una mezcla de fagos normales y defectuosos. La infección de una cepa aceptora B^- con un fago normal conduce por lo general a la lisis de la célula. No obstante, unas pocas células incorporan fagos transductores defectuosos cuyo DNA puede recombinarse con el cromosoma aceptor. Se intercambian fragmentos homólogos de DNA con lo que puede establecerse una complementación del gen defectuoso en el aceptor por un gen intacto del dador.

Como únicamente se transfieren pequeños fragmentos de DNA la probabilidad de que se recombine un carácter determinado es muy baja. Se encuentra entre 10^{-6} y 10^{-8}. También resulta comprensible que en el fago P22 de *Salmonella*, lo mismo que en el fago transductor inespecífico P1 de *Escherichia coli* sólo pueda transducirse una característica, o genes muy próximos, por la misma partícula fágica; la cantidad de DNA que corresponde al DNA del fago es tan sólo del 1-2% del DNA bacteriano. Una excepción la plantea el fago PBS1 de *Bacillus subtilis*; puede transducir hasta un 8% del genoma del hospedador.

Transducción específica. El fago lambda ofrece el ejemplo más conocido de transducción específica, tal como se ha indicado en la pág. 159 y siguientes. Lambda transduce normalmente tan sólo genes específicos, como el *gal* (utilización de galactosa) y el *bio* (síntesis de biotina). Tal como se ha indicado, lambda se integra al pasar al estado de profago en un punto específico del cromosoma del hospedador, entre los genes *gal* y *bio*. En el curso de la escisión, provocada por ejemplo mediante radiaciones UV, el DNA del fago puede no separarse de una forma totalmente exacta, sino que un fragmento quede en el cromosoma del hospedador, a cambio de que genes próximos del DNA del hospedador se escindan con el DNA fágico.

Si los fagos transductores infectan una célula aceptora que sea defectuosa en el gen correspondiente, p. ej. gal^-, puede tener lugar una recombinación por intercambio entre los genes defectuosos del hospedador y el gen intacto transducido. Los recombinantes resultantes o transductantes son en este caso gal^+.

De forma semejante se comporta la transferencia de genes por el fago Phi 80. Se integra en las proximidades de los genes que codifican a los enzimas de la biosíntesis del triptófano. Por ello el Phi 80 es especialmente apropiado para la transferencia de los genes *trp*.

En comparación con la transducción inespecífica, en la transducción específica es imprescindible la integración del fago en el genoma del hospedador para que la transferencia sea efectiva.

15.2.4 Conjugación

Se denomina conjugación a la transferencia de material genético por contacto directo de una célula a otra. Debido a indicios morfológicos se suponía ya desde hace tiempo que podía darse un apareamiento también entre bacterias. Experiencias con mutantes múltiples aportaron la demostración inequívoca de que entre las bacterias era posible una transferencia de material genético a través del contacto directo de célula a célula. LEDERBERG y TATUM realizaron en 1946 el experimento de cruzamiento decisivo con dos mutantes de *E. coli* K12, cada una de las cuales era auxótrofa para dos aminoácidos distintos (Fig. 15.16). Una doble mutante era auxó-

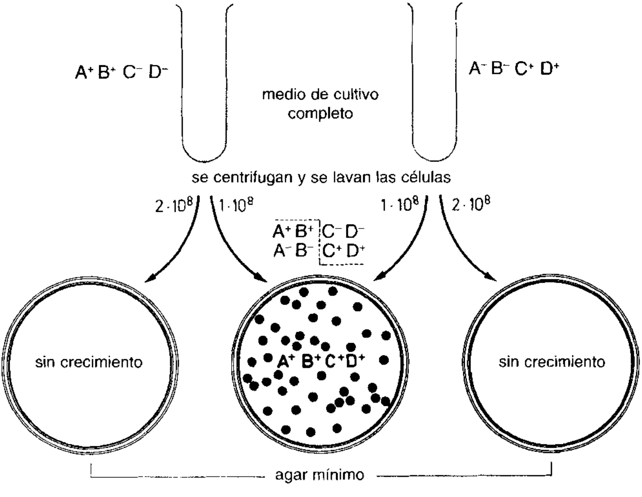

A⁺ B⁺ C⁻ D⁻
medio de cultivo completo
A⁻ B⁻ C⁺ D⁺
se centrifugan y se lavan las células
2·10⁸
1·10⁸
1·10⁸
2·10⁸
A⁺ B⁺ C⁻ D⁻
A⁻ B⁻ C⁺ D⁺
sin crecimiento
A⁺ B⁺ C⁺ D⁺
sin crecimiento
agar mínimo

Fig. 15.16 Recombinación por conjugación de dos mutantes por defectos distintos y recíprocos de la cepa K 12 de *Escherichia coli* (según BRAUN, W.: Bacterial Genetics. Saunders, Filadelfia, 1965).

trofa para A y B, pero era capaz de sintetizar C y D ($A^- B^- C^+ D^+$), la otra era complementaria (recíproca, $A^+ B^+ C^- D^-$). Estos mutantes no pueden desarrollarse sobre un medio de cultivo mínimo y no forman colonias. No obstante, si se sembraban sobre medio mínimo suspensiones de una mezcla de los dos mutantes aparecían colonias. Estas células tenían la capacidad hereditaria de sintetizar todos los aminoácidos, eran por tanto del tipo $A^+ B^+ C^+ D^+$ (prototrofos). Se habían producido en la proporción $1{:}10^6$, y se denominaron **recombinantes genéticos**, ya que reunían la información genética de dos células maternas recíprocamente defectivas. La utilización de mutantes múltiples como cepas maternas excluía la posibilidad de que creciesen revertientes, ya que la probabilidad de una reversión simultánea de dos genes se encuentra en el orden de magnitud de 10^{-14} hasta 10^{-16} por generación.

Transferencia direccional desde la célula dadora a la célula aceptora. Experimentos de cruzamiento en los que uno de los participantes era una cepa resistente a la estreptomicina permitieron demostrar que el material genético únicamente se transfiere siguiendo una sola dirección. Si después del cruzamiento se sembraban las células sobre un medio de cultivo que contuviese estreptomicina aparecían únicamente recombinantes cuando una de las cepas (cepa receptora) era resistente a la estreptomicina y sobrevivía. El que el otro elemento sensible a la estreptomicina muriese, no era importante cuando hubiese cumplido con su misión de transferencia del material genético. La consecuencia de ello era la transferencia unidireccional del material genético desde una cepa **dadora** (masculina) a otra **aceptora** (receptora, femenina) y que todo el proceso de recombinación y segregación tenía lugar en la célula aceptora. Los recombinantes heredaban la mayoría de sus características del aceptor; el dador únicamente aportaba fragmentos de su genoma.

Factor F y estado Hfr. Durante la investigación de este proceso de apareamiento se estableció que el estado de dador en las bacterias iba ligado a la presencia de un elemento de DNA transferible, el **factor sexual F** (F de fertilidad). El factor F es una molécula circular, cerrada, de DNA de doble cadena con un tamaño de 100 kb. Como elemento de DNA extracromosómico y de replicación autónoma hay que considerarlo como un **plásmido**. Contiene los genes responsables del proceso de la conjugación. Entre ellos se encuentran los genes que determinan unas estructuras especiales en la superficie celular, p. ej. los **pili F** (véase Fig. 15.17). Éstos son imprescindibles para la conjugación. Hay dos o tres en la superficie celular. Se utilizan probablemente para el establecimiento del contacto entre las células dadoras y receptoras, y permiten la formación de los llamados agregados de cruzamiento, ya que la célula dadora puede entrar en contacto con varias

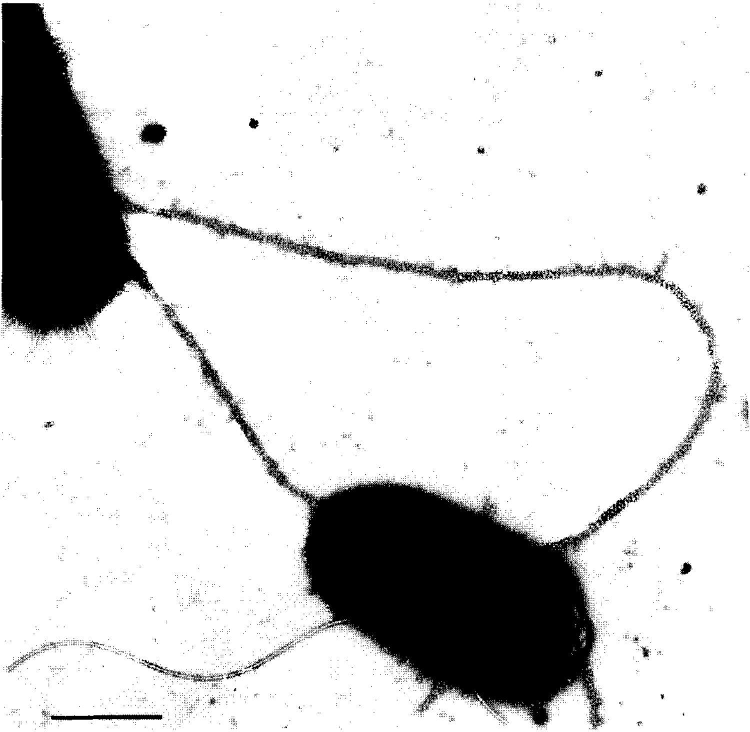


Fig. 15.17 Células de *Escherichia coli* unidas por pili F. Los dos pili F de la célula Hfr están marcados por fagos RNA MS-2 que son específicos de dadores. Los numerosos pili tipo I de la célula receptora (arriba) son cortos y no adsorben al fago. Micrografía electrónica de un contraste negativo con ácido fosfotúngstico. La barra tiene una longitud de 1 μm (de CURTISS, R.; CARO. L.G., ALLISON, D.P., STALLIONS, D.R.: J. Bacteriol. 100 [1969] 1091).

receptoras. El DNA del factor F pasa al receptor por fusión parcial de la pareja de células.

Dentro de una población F^+ son pocas las bacterias capaces de una transferencia de DNA cromosómico. Estas bacterias tienen el factor F integrado en el cromosoma bacteriano (Fig. 15.18). Si se utilizan clones de estas células dadoras en experimentos de conjugación se forman recombinantes con una frecuencia varios miles de veces superior que en los cruzamientos con cepas F^+. Estas células dadoras con "elevada frecuencia de recombinación" se denominan **Hfr** ("high frequency of recombinants").

La inserción del factor F tiene lugar gracias a elementos IS (apartado 15.2.1) que se presentan tanto en el factor F como en el cromosoma de *E. coli*. Así, los elementos IS2 y IS3 específicos del factor F se pueden integrar en cualquier lugar del cromosoma de *E. coli* donde haya una copia del elemento IS correspondiente. La reacción se basa en una recombinación homóloga y es reversible. Como los elementos IS son capaces de transponerse, puede darse un cointegrado entre el factor F y el cromosoma, en una reacción independiente de RecA.

Transferencia de genes cromosómicos. Si se mezcla una población de células Hfr con un exceso de células F^- prácticamente cada célula Hfr encuentra a una célula F^- para conjugarse. En el famoso experimento de la "conjugación interrumpida" se fueron tomando muestras a lo largo

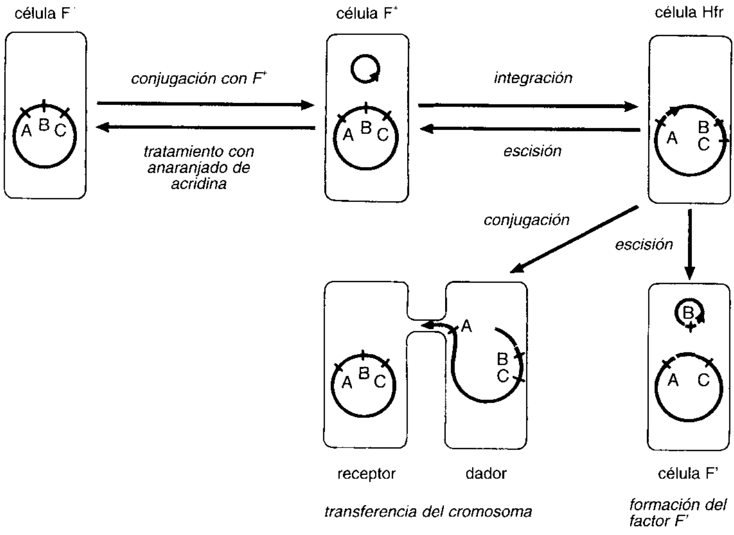

célula F^-
célula F^+
célula Hfr
conjugación con F^+
tratamiento con anaranjado de acridina
integración
escisión
A B C
A B C
A B C
conjugación
escisión
A
B
C
receptor
dador
transferencia del cromosoma
B
A C
célula F'
formación del factor F'

Fig. 15.18 Procesos de transferencia ligados al factor F. La célula F^- puede actuar únicamente como receptora. Por conjugación con una cepa F^+ o Hfr puede recibir el factor F y convertirse en una célula F^+. En la célula F^+ el factor F se presenta como una molécula circular cerrada de DNA. El factor F puede eliminarse por tratamientos con anaranjado de acridina. Por su integración en el cromosoma bacteriano la célula pasa al estado Hfr. La inserción puede realizarse en distintos lugares del cromosoma, así como con orientación distinta, y determina el inicio y la dirección de la transferencia del cromosoma (marcada por una punta de flecha). Por una separación incorrecta del factor F del cromosoma puede formarse un factor F que contiene un pequeño fragmento de DNA cromosómico; se denomina factor F'.

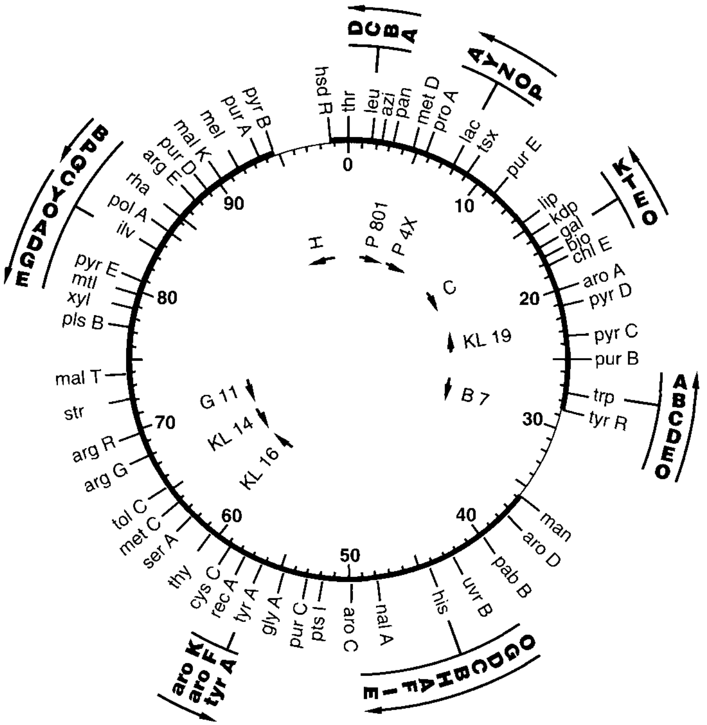

0
10
20
30
40
50
60
70
80
90
D C B A
A Y Z O P
K T E O
A B C D E O
E I F A H B C D G O
aro K
aro F
tyr A
B P Q C Y O A D G E
hsd R
thr
leu
azi
pan
met D
pro A
lac
tsx
pur E
lip
kdp
gal
bio
chl E
aro A
pyr D
pyr C
pur B
trp
tyr R
man
aro D
pab B
uvr B
his
nal A
aro C
pts I
pur C
gly A
tyr A
rec A
cys C
thy
ser A
met C
tol C
arg G
arg R
str
mal T
pls B
xyl
mtl
pyr E
ilv
pol A
rha
arg E
pur D
mal K
mel
pur A
pyr B
H
P 801
P 4X
C
KL 19
B 7
G 11
KL 14
KL 16

Fig. 15.19 Mapa genético del cromosoma de *Escherichia coli*. Las cifras dan las distancias relativas de los genes en lapsos de tiempo (minutos), en los que los genes llegan a la célula receptora en la conjugación (en caldo nutritivo a 37°C). Las flechas rojas en el interior del círculo marcan la secuencia en la que los genes llegan a la bacteria receptora en la conjugación con distintas cepas Hfr. La dirección de migración del cromosoma es opuesta a la de la flecha. Las flechas rojas externas indican la dirección en la que se leen los genes individuales de un operón durante la transcripción (p. ej. en el operón *lac* P, O, Z, Y, A). Aclaraciones de los símbolos de los genes: *azi* = resistencia a la acida; *bio* = requerimiento de biotina; *gal* = utilización de la galactosa; *his* = requerimiento de histidina con los genes de los enzimas implicados en la síntesis de histidina; *ilv* = requerimiento de isoleucina y valina; *lac* = operón lac con los genes P = promotor, O = operador, Z = *ß-galactosidasa*, Y = *galactósido-permeasa*, A = *tiogalactósido transacetilasa*; pro A = requerimientos de prolina (bloqueo antes del glutamato semialdehído); *rec* A = capacidad de recombinación genética y reparación de daños por radiaciones; *thr* = requerimiento de treonina; *trp* = requerimiento de triptófano (vuelto a dibujar, según Bachmann, B.J.; Low, K.B.; Trotter, A.L.: Bacteriol. Rev. 40 [1976] 116). La nueva versión (8ª) del mapa genético en B.J. Bachmann: Microbiol. Rev. 54 [1990] 130-197.

del tiempo de una mezcla de este tipo. Una agitación intensa permite separar violentamente a los dos conjugantes; se interrumpe el apareamiento. A continuación se sembraron las muestras sobre placas de agar y se aislaron los recombinantes. Después se comprobó en las cepas recombinantes cuáles eran los genes de la célula dadora que habían llegado a la aceptora. El análisis dio como resultado que cada gen era transferido a la célula receptora al cabo de un tiempo muy bien determinado a partir del inicio del apareamiento (Fig. 15.18). La sucesión temporal de la transferencia de genes coincidía totalmente con la sucesión de los genes en el cromosoma bacteriano, tal como se había determinado por análisis genéticos. Cepas Hfr aisladas independientemente a partir de la misma cepa F^+ se diferencian en dos características básicas. Cada cepa Hfr transfiere el cromosoma con un inicio (punto de partida) distinto al del otro, y con una orientación específica de los genes en la célula aceptora. Esto significa que una cepa Hfr determinada está compuesta por una población homogénea, en la que todas las células transfieren el cromosoma a partir del mismo punto de inicio y en el mismo sentido.

En la transferencia del DNA, el DNA bacteriano se replica a partir del punto de inserción del factor F, y la cadena de nueva síntesis se introduce con el extremo 5' por delante en la célula receptora (Fig. 15.18). En este proceso de transferencia la recombinación de los DNA del dador y del receptor tienen lugar en la célula receptora (es la recombinación homóloga).

Mapa genético. Según el método anteriormente indicado del apareamiento interrumpido, en el que se determina la transferencia de los genes del dador al aceptor a lo largo del tiempo, puede establecerse un mapa de la ordenación de los genes en el cromosoma bacteriano (Fig. 15.19). La transferencia de todo el cromosoma de *Escherichia coli* a 37°C dura aproximadamente 100 minutos.

La velocidad de la transferencia es constante durante todo el proceso. Por tanto, el tiempo de penetración de los genes en la célula aceptora es una medida de la distancia entre los genes. Diferencias de menos de un minuto no pueden determinarse en este proceso cinético. Un mapado más preciso puede realizarse mediante análisis de acoplamiento por transducciones fágicas.

El mapa genético de la figura 15.19 de *E. coli* está muy simplificado. Actualmente se conoce la localización de más de 1400 genes. La sucesión de los genes en el cromosoma bacteriano se ha establecido para *Salmonella typhimurium*, *Streptomyces coelicolor*, *Bacillus subtilis*, *Pseudomonas aeruginosa* y otras bacterias.

Transferencia de genes mediante factores F. La integración del factor F en el cromosoma bacteriano es reversible. El factor F puede escindirse del cromosoma y la célula Hfr pasa al estado de célula F^+ (Fig. 15.18). Este proceso de escisión tiene lugar aproximadamente con la misma frecuencia que el de integración. La separación correcta implica que la rotura tenga lugar exactamente en el mismo punto que la integración. En algunos casos poco frecuentes, no obstante, tiene lugar en un punto muy próximo; como consecuencia, en la escisión queda un fragmento de DNA vecino fijado al factor F. Este factor F que contiene un pequeño fragmento de DNA cromosómico se denomina factor F'. La formación del factor F' es homóloga al establecimiento de un fago transductor específico (véase pág. 520).

La célula que contiene al factor F' se denomina célula F' primaria. El DNA integrado en el factor F puede entonces ser transferido desde las células dadoras F' a cepas F^- con la misma frecuencia (100%), lo mismo que el factor F desde cepas F^+ a F^-. El mismo fragmento de DNA se transferiría por una cepa Hfr únicamente con una frecuencia máxima del 1% hasta cepas F^-. Si se transfiere el factor F' de una célula F' primaria en la que se ha formado, hasta otra célula F^- normal, se formará una célula F' secundaria. En ella se encontrará un fragmento del cromosoma bacteriano duplicado (en estado diploide).

Presencia de la conjugación en otros grupos bacterianos. La transferencia de genes por conjugación se descubrió en *Escherichia coli* y es muy frecuente entre las enterobacterias. Los procesos naturales de conjugación se han investigado profundamente en *Streptomyces coelicolor*, especies de *Nocardia*, *Rhizobium*, *Alcaligenes*, *Pseudomonas* y otras especies bacterianas o géneros. El intercambio de genes por conjugación y la movilización de genes por plásmidos están probablemente muy extendidos en el reino de los procariotas.

15.3 Plásmidos

Muchas bacterias pueden tener elementos de DNA extracromosómicos. Se denomina plásmido a esta doble cadena de DNA circular y cerrada, pequeña en comparación con el cromosoma bacteriano. Son prescindibles en las condiciones normales de crecimiento de las bacterias; células "curadas" del plásmido por tratamientos con radiaciones UV, mitomicina C o colorantes de acridina, crecen bien sobre los medios de cultivo habituales. Los plásmidos se reconocen por las características especiales que confieren a la célula hospedadora. Algunos plásmidos confieren a la célula hospedadora la capacidad de conjugarse con otras células como se ha explicado en el ejemplo del factor F de *E. coli* (apartado 15.2). Así consiguen al mismo tiempo una expansión de célula a célula por contacto directo. Otros plásmidos pueden perder transitoriamente su estado autónomo e integrarse en el cromosoma bacteriano como un profago. Los plásmidos son capaces de movilizar genes del hospedador, y así, en condiciones naturales pueden favorecer el intercambio y la nueva combinación de caracteres genéticos. En la manipulación genética (apartado 15.5) donde se emplean los plásmidos como "transbordadores de genes" para introducir DNA exógeno, se emplean los métodos necesarios de forma análoga a los procesos que tienen lugar en la naturaleza. Los plásmidos también se encuentran en los eucariotas, aunque ahí aún no se hayan estudiado tan intensamente.

15.3.1 Características y demostración de la presencia de los plásmidos

Para que un plásmido pueda comportarse de forma semejante a una molécula de DNA extracromosómica y autónoma, de forma semejante al cromosoma bacteriano, ha de tener forzosamente un origen de replicación (*ori*) (Fig. 15.20). El **número de copias** de un plásmido determinado en la célula es una característica específica del plásmido. La replicación está catalizada por proteínas celulares; funciones codificadas por el plásmido determinan el momento de inicio de la replicación y la distribución de las copias del plásmido en las células hijas. Los plásmidos pequeños con un elevado número de copias hacen varios ciclos de replicación durante un ciclo celular.

Amplificación. El plásmido mejor estudiado, ColE1 (Fig. 15.20), que en *E. coli* codifica para la bacteriocina colicina E1, tiene un tamaño de 6646 pares de bases (pb) y pertenece a los plásmidos pequeños. Normalmente la replicación del DNA cromosómico del hospedador se inhibe transcurri-

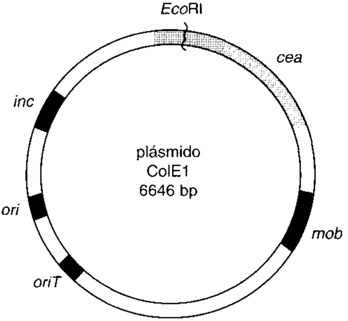


Fig. 15.20 Mapa genético del plásmido ColE1 de *Escherichia coli*. Abreviaturas: *ori*, origen de replicación; *oriT*, origen de transferencia; *inc*, incompatibilidad; *mob*, función de movilización; *cea*, gen estructural de la colicina E1; *Eco*R1, punto de corte para la *endonucleasa Eco*R1

da una hora después de la adición de cloranfenicol; por el contrario, la replicación del plásmido ColE1 continúa otras 12-15 horas sin ningún impedimento. Ello conduce a un incremento en el número de copias, desde 15 hasta unas 1200 por cromosoma; este proceso se denomina **amplificación** del DNA plasmídico y se ha comprobado en toda una serie de plásmidos. Mientras que para la replicación del cromosoma es necesaria una síntesis proteica continua, los plásmidos amplificables requieren para su replicación únicamente proteínas que son estables y funcionales en la célula durante un largo período de tiempo.

Incompatibilidad. Muchas bacterias contienen varios plásmidos distintos. La coexistencia de varios plásmidos en una célula bacteriana indica que los plásmidos son compatibles. Dos plásmidos relacionados no pueden coexistir de forma estable en la misma célula; son incompatibles. Los plásmidos se dividen en grupos de incompatibilidad, abreviadamente Inc. Los plásmidos que pertenecen a un mismo grupo no pueden coexistir. Hasta ahora se han definido unos 30 grupos de incompatibilidad en *E. coli* y 10 en *Staphylococcus*. La incompatiblidad de los plásmidos está controlada por determinantes ligados al plásmido, localizados en la llamada región *inc* (Fig. 15.20). El establecimiento de la incompatibilidad está ligado al control de la replicación del plásmido. Los plásmidos incompatibles se inhiben mutuamente en la replicación, de un modo complejo y aún no totalmente aclarado.

Propiedades físicas. Independientemente de algunas excepciones, el tamaño de los plásmidos es inferior a un décimo del tamaño del cromosoma de *E. coli* (< 450 kb). Naturalmente, se han descrito plásmidos con una variación de tamaños desde 2 hasta 1200 kb. El DNA plasmídico de doble cadena se puede aislar como una molécula covalente, circular y cerrada (ccc). Esta doble hélice circular está retorcida sobre sí misma y adquiere una configuración compacta que se denomina "superenrollada". Un corte en una de las dos cadenas le hace perder esta estructura secundaria compacta y adquiere una forma circular abierta ("open" oc) con otras propiedades físicas. Una rotura doble del plásmido conduce finalmente a una molécula de DNA lineal que físicamente ya no es distinguible de fragmentos de cromosoma que aparecen durante la lisis celular. Para el aislamiento del DNA plasmídico se recurre a las propiedades físicas especiales de la molécula ccc. El DNA plasmídico sedimenta por ultracentrifugación de una forma más rápida que el DNA lineal, tiene una menor afinidad por los agentes intercalantes como el bromuro de etidio, que hacen disminuir la densidad. Debido a esta mayor densidad, el DNA plasmídico forma una banda en los gradientes de cloruro de cesio en una posición distinta del DNA cromosómico y puede aislarse así fácilmente. Las moléculas plasmídicas de distinto tamaño pueden separarse electroforéticamente en un gel de agarosa. La velocidad de migración de los ácidos nucleicos entre los poros del gel depende del peso molecular y de la estructura de la molécula. Debido a su configuración compacta, los plásmidos pequeños migran más rápidamente que el DNA lineal, mientras que los plásmidos grandes lo hacen más lentamente. Mediante patrones estándar de peso molecular conocido apropiados, y a través de la velocidad de migración, puede calcularse el tamaño de un plásmido determinado. El bandeo del DNA en el gel se puede visualizar por tinción con bromuro de etidio y observación de la fluorescencia emitida en la luz ultravioleta. Una técnica más compleja para la demostración de plásmidos es la de la microscopía electrónica, pero que por otra parte permite medir la longitud de moléculas aisladas, y con ello una determinación muy precisa del tamaño.

Plásmidos conjugativos. En el capítulo anterior hemos presentado ya el factor de fertilidad (F) de *E. coli*. Es un modelo de plásmido autotransmisible o plásmido conjugativo. Todos los plásmidos conjugativos conocidos hasta ahora disponen de funciones de transferencia, los llamados genes *tra*, que permiten la transmisibilidad de los plásmidos conjugativos por contacto celular. Los genes *tra* codifican para la formación de pili sexuales que sirven para el establecimiento del contacto entre las células conjugantes. Además, codifican para proteínas necesarias en la estabilización de la pareja de células apareadas, la transferen-

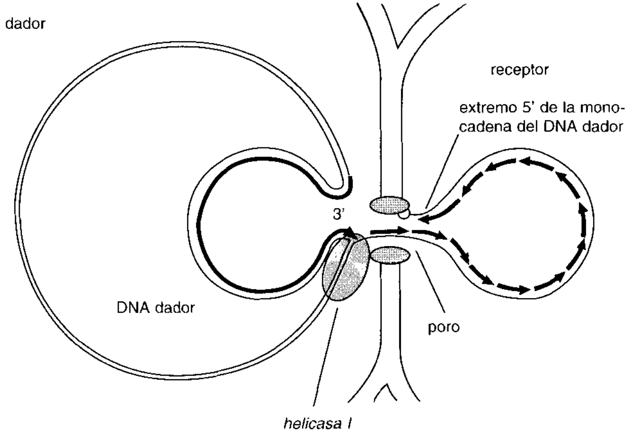


Fig. 15.21 Modelo de transferencia del DNA del dador al receptor durante la conjugación. Tras la rotura de una cadena en el *oriT* se transporta la cadena sencilla con el extremo 5' por delante a través de un poro que une al dador y al receptor. En el dador la doble cadena se desovilla por acción de la *helicasa I* y se completa como doble cadena por síntesis continua. En el receptor se da una síntesis discontinua (según W. SCHUMANN, 1990).

cia conjugativa del DNA, su regulación y para ayudar a otros plásmidos. La región *tra* del factor F abarca 30 kb, y se han mapeado en ella 31 genes. La transferencia conjugativa del DNA se completa temporalmente en diversas fases: 1. En el origen de transferencia-replicación (*oriT*) se da un corte en una cadena. El *oriT* es una secuencia de DNA de 373 pb, que es reconocida por proteínas ("DNA-binding") y que es distinto del origen de replicación vegetativo (*ori*) (Fig. 15.20). 2. Partiendo de *oriT* se desenrolla el DNA en sentido 5' → 3'; el proceso está catalizado con consumo de ATP por dos proteínas específicas de transferencia. 3. El extremo 5' se desliza por un poro que une a la célula dadora con la receptora y llega hasta ella. 4. En un proceso simultáneo se sintetiza en el dador de forma continua la doble cadena complementaria a partir del extremo 3', según el mecanismo del círculo rodante ("rolling-circle"). La síntesis de la doble cadena en el receptor se realiza de forma discontinua con fragmentos de RNA como iniciadores (primers) (Fig. 15.21).

Los plásmidos conjugativos se han encontrado en numerosas bacterias Gram negativas, además de *E. coli*. Entre las bacterias Gram positivas se han encontrado en los géneros *Bacillus, Clostridium, Nocardia, Staphylococcus, Streptococcus* y *Streptomyces*. Un grupo de plásmidos conjugativos de *Streptococcus faecalis* que se transfieren con una alta eficacia, codifican para una señal especial de apareamiento, la **feromona sexual**. Desencadena en la célula dadora la síntesis de una sustancia de agregación. Este producto, conocido como adhesina, une al dador y al receptor y conduce a la agregación de los dos tipos celulares.

Plásmidos de amplio espectro de huéspedes. La mayoría de los plásmidos tiene un espectro de huéspedes muy estrecho, que únicamente permite la replicación en especies muy próximas. No obstante, también se conocen plásmidos que tienen un espectro amplio. Entre las bacterias Gram negativas hay que mencionar especialmente al plásmido conjugativo de resistencia RP4 del **grupo IncP1**, y el plásmido de resistencia no conjugativo RSF1010 del **grupo IncQ**. El primero da resistencia frente a los antibióticos ampicilina, kanamicina y tetraciclina, así como al metal pesado teluro; el último da a su portador resistencia frente a estreptomicina y sulfamidas. Hay muy pocas bacterias Gram negativas en las que estos plásmidos no puedan establecerse de forma estable y reproducirse.

El conocimiento de los plásmidos de espectro ampliado en el grupo de las bacterias Gram positivas aún está muy limitado. No obstante, a partir de *Streptococcus faecalis* se han aislado plásmidos conjugativos que se pueden replicar en receptores de los géneros *Staphylococcus, Bacillus* y *Lactobacillus*. El plásmido pC194 de *Staphylococcus aureus* tiene un espectro de hospedadores especialmente amplio, que se extiende desde bacterias como *B. subtilis*, hasta Gram negativas como *E. coli* o incluso eucariotas como *Saccharomyces cerevisiae*.

Aún no están claramente definidas las propiedades que determinan que un plásmido tenga un espectro amplio de huéspedes. A pesar de ello, llama la atención que estos plásmidos codifiquen para varias funciones de replicación, que probablemente les hacen independientes de las actividades del hospedador. Los plásmidos de un espectro restringido no requieren para su replicación ninguna proteína codificada por el plásmido, p. ej. ColE1 (Fig. 15.20), o bien una única proteína necesaria para la iniciación de la replicación.

Los plásmidos conjugativos pueden actuar como "**plásmidos helper**", permitiendo la transferencia de plásmidos no conjugativos desde un dador a un receptor. Este proceso se denomina **movilización de plásmidos**. Se puede encontrar la explicación en dos mecanismos. 1. El plásmido no conjugativo, pero movilizable, se cotransfiere con el conjugativo. 2. Es necesaria una interacción por recombinación entre las dos moléculas plasmídicas, y el cointegrado resultante llega a la célula receptora, donde se vuelve a separar en los dos plásmidos originales. El plásmido movilizable ColE1 codifica para la llamada región *mob* (Fig. 15.20), tres proteínas movilizadoras, necesarias para la transferencia de ColE1.

Plásmidos lineales. Los plásmidos lineales, cuyo DNA no está cerrado covalentemente en un anillo, constituyen la excepción dentro de los procariotas. Hasta ahora se han encontrado en estreptomicetos, estreptococos y en cepas de *Nocardia opaca*. No se sabe de qué forma el DNA está protegido de la degradación por *exonucleasas*.

15.3.2 Significación biológica de los plásmidos

Los plásmidos están ampliamente distribuidos entre las bacterias. Con frecuencia se identifican exclusivamente por su presencia física, sin que den a su hospedador características fenotípicas reconocibles. Se les denomina **plásmidos crípticos**. A continuación se da una selección de plásmidos que, además de su replicación, codifican para una serie de funciones reconocibles fenotípicamente. Llama la atención, que las características codificadas por el plásmido confieran frecuentemente ventajas en el crecimiento a la célula hospedadora, y representen así una característica de selección positiva.

Plásmidos de resistencia. Las bacterias resistentes frente a varios antibióticos se descubrieron por primera vez en los años 50 en Japón. Se trata de cepas del causante de la disentería, *Shigella*, aislada a partir de enfermos que habían sido tratados con antibióticos. Lo sorprendente fue que estas bacterias poseían una resistencia múltiple y que era transferible por contacto a otras bacterias, también a *Escherichia coli*. Tal como se sabe actualmente, los plásmidos de resistencia (R) tienen genes que determinan la resistencia frente a sulfonamidas, estreptomicina, cloranfenicol y tetraciclina. Algunos factores R determinan la resistencia hasta frente a ocho antibióticos, otros dan resistencia frente a metales pesados tóxicos como por ejemplo el mercurio, el níquel, el cadmio, el cobalto, el zinc, el cromo, el arsénico, el antimonio, el teluro o la plata. Normalmente los plásmidos de resistencia son movilizables o conjugativos. Algunos plásmidos R tienen un amplio espectro de huéspedes; pueden ser transferidos entre distintos géneros bacterianos, lo cual favorece su expansión. En algunos casos se vio que la transferencia del factor R podía conllevar la transferencia de genes cromosómicos, que aparentemente eran movilizados por el factor R.

El mecanismo de resistencia frente a los antibióticos, determinado por los factores de resistencia o por el cromosoma, puede ser distinto. Un ejemplo lo ofrece la resistencia frente a la estreptomicina. La resistencia frente a la estreptomicina determinada cromosómicamente se basa en la modificación de la subunidad 30S de los ribosomas (pág. 39). Por el contrario, la resistencia frente a la estreptomicina debida a un factor R se fundamenta en la modificación enzimática del antibiótico que se inactiva por adenilación. La modificación química catalizada enzimáticamente de los antibióticos es una causa frecuente de la resistencia determinada por plásmidos: así, el cloranfenicol es acetilado, la kanamicina y la neomicina son fosforiladas y acetiladas, y la penicilina se inactiva por una *penicilinasa*. Debido a que los antibióticos se utilizan en la práctica terapéutica de forma habitual, sobre todo en los hospitales, se da una diseminación de los plásmidos R entre las bacterias patógenas, y una selección y acumulación de bacterias resistentes a los antibióticos. La acumulación de varias resistencias en un solo plásmido se comprende desde el punto de vista del elevado potencial de recombinación de los plásmidos y de la elevada presión de selección. Resulta incomprensible el papel de los plásmidos de resistencia anterior a la utilización de los antibióticos en la praxis terapéutica. Se han encontrado en bacterias que se habían conservado desde 1940, esto es, antes del inicio de la terapia antibiótica.

A partir de suelos y aguas que contienen de forma natural sales de metales pesados, o que se han contaminado con ellos, pueden aislarse bacterias resistentes a los metales. Estas bacterias no suelen poderse aislar de suelos no contaminados. La información genética para la resistencia a metales puede localizarse en el cromosoma o en plásmidos. La resistencia puede basarse en un eflujo, esto es, en una exportación debida a una *ATPasa* o un antiporte de los iones tóxicos introducidos en la célula. La diseminación de bacterias resistentes a metales pesados dependiente de las condiciones del hábitat indica que la presión de selección para el mantenimiento de la información genética en un ecosistema desempeña un papel muy importante.

Factores bacteriocinogénicos. Muchas bacterias forman proteínas capaces de matar o inhibir el crecimiento de especies o cepas próximas. Estas bacteriocinas de acción muy específica están codificadas por plásmidos, los factores bacteriocinogénicos. Se han aislado bacteriocinas de *Escherichia coli* (colicina), *Pseudomonas aeruginosa* (piocina), *Bacillus megaterium* (megacina) y de otras bacterias.

Factores de patogenicidad o virulencia. El organismo humano y el animal, debido a las secreciones que pueden servir de nutrientes, y debido a las condiciones ambientales relativamente constantes, ofrecen las premisas ideales para el desarrollo de muchos microorganismos. Hay miles de millones de bacterias que pertenecen a la flora normal de la piel y del tracto intestinal. Muchos tienen un papel beneficioso, cuando no esencial, para el estado de salud del organismo superior. Junto a estos comensales inocuos existen otras bacterias que causan perjuicios a su hospedador. El hombre y los animales han desarrollado a lo largo de la evolución una serie de barreras que les protegen frente a la invasión y multiplicación de bacterias patógenas; a ellas pertenecen la piel, el sistema inmunitario y factores sanguíneos. Por su parte, los organismos patógenos han elevado su agresividad desarrollando factores de patogenicidad o viru-

Tab. 15.3 Algunos plásmidos degradativos.

Sustancia	Denominación del plásmido	Hospedador
Tolueno	TOL	*Pseudomonas putida*
Naftaleno	NAH	*Pseudomonas putida*
Ácido 2,4 diclorofenoxiacético	2,4-D	*Acinetobacter, Alcaligenes,* *Arthrobacter, Corynebacterium* *Pseudomonas, Flavobacterium*
n-Alcanos	OCT	*Pseudomonas putida*
Salicilato	SAL	*P. putida, P. aeruginosa*
Terpenos	CAM	*Pseudomonas putida*
Nicotina	NIC	*Arthrobacter oxydans* *Pseudomonas convexa*

lencia. Muchos de estos factores están codificados plasmídicamente. La localización extracromosómica conduce a la rápida diseminación de estos factores. Factores de colonización permiten una colonización de las superficies mucosas sin impedimentos. Las invasinas codificadas por plásmidos permiten una penetración activa de una cepa de *Shigella flexneri*, patógena del hombre, en las células epiteliales del intestino. Las enterotoxinas, que ejercen su función tóxica en el tracto intestinal, generan diarreas y son también de codificación plasmídica. Las hemolisinas conducen a la lisis de eritrocitos. En muchas cepas patógenas de *E. coli* los determinantes genéticos se localizan en plásmidos. Para la invasión de enterobacterias patógenas en células y tejidos es una premisa importante el disponer de iones hierro: no debe extrañar que sideróforos quelantes de hierro, como por ejemplo la aerobactina, estén codificados por plásmidos.

Un ejemplo de la función de los plásmidos en el desencadenamiento de enfermedades vegetales es el plásmido inductor de tumores de *Agrobacterium tumefaciens*, cuya acción virulenta ya se ha explicado (véase pág. 162). La acción insecticida (la toxina BT) de los cuerpos de inclusión de *Bacillus thuringiensis* (pág. 78) está igualmente codificada en un plásmido de unas 100 kb.

Plásmidos degradativos. Los plásmidos pueden llevar también genes que determinan características bioquímicas especiales. Se trata especialmente de genes que catalizan la degradación de sustancias de síntesis química que no se encuentran de forma natural en la biosfera (xenobióticos). Entre ellos se cuentan numerosos compuestos aromáticos y heterocíclicos con sustituyentes halogenados, que sólo pueden ser degradados por especialistas dentro de las bacterias. Muchas de estas sustancias, entre las que se encuentran herbicidas, insecticidas, fungicidas, entre otros, son degradadas únicamente por bacterias que disponen de plásmidos degradativos. La tabla 15.3 da una visión de algunos plásmidos degradativos seleccionados.

Plásmidos con otras propiedades. La lista de propiedades codificadas por plásmidos es muy larga, casi interminable. Incluye genes de reacciones metabólicas complejas, p. ej. de la fijación del nitrógeno, formación de nódulos, producción de ácido indolilacético o diacetilo, transporte de azúcares o iones metálicos (níquel), síntesis de hidrogenasas y enzimas de la desnitrificación. Estos plásmidos metabólicos son normalmente moléculas gigantes, con tamaño entre 300 y 1200 kb y se denominan "megaplásmidos". Ocasionalmente pueden estar también codificados plasmídicamente los sistemas de restricción y modificación (apartado 15.4) que protegen a las bacterias de la penetración de DNA exógeno. Típico de las características anteriormente indicadas es que en algunas cepas los genes están localizados en el cromosoma y en otras en plásmidos. Esto es válido para cepas de la misma especie bacteriana y también para distintas cepas de bacterias relacionadas estrechamente desde el punto de vista filogenético. La localización alternativa de los genes, indica que genes, o complejos completos de genes pueden intercambiarse entre cromosoma y plásmido, y que los plásmidos desempeñan un papel significativo en la evolución del genoma procariótico.

15.4 Restricción y modificación del DNA

La observación de que virus que habían crecido sobre determinadas cepas de *E. coli* no podían multiplicarse sobre otras cepas distintas condujo al conocimiento de la restricción y la modificación. Se demostró que había enzimas bacterianos responsables de esta **restricción**, que reconocen al DNA vírico como "exógeno" y lo cortan en puntos específicos, mientras que el DNA propio se protege por modificación enzimática y no es reconocido por la restricción.

Los sistemas de restricción y modificación están ampliamente extendidos entre los microorganismos. Se utilizan para marcar específicamente al DNA propio y para destruir por degradación al DNA exógeno que pueda penetrar. El sistema está compuesto de dos actividades enzimáticas, una *endonucleasa* y una *metil-transferasa*, que pueden estar en una misma proteína o distribuidas en diversas proteínas. Las dos ejercen su actividad en un fragmento determinado del DNA, la secuencia de reconocimiento. En el caso del DNA propio esta secuencia se modifica químicamente por la *metil-transferasa*, concretamente por metilación de la adenina en la posición N-6 y de la citosina, preferentemente en las posiciones N-5 o N-4; en el caso del DNA exógeno se rompe por hidrólisis del enlace fosfodiéster a través de la *endonucleasa*. Una secuencia de nucleótidos determinada es siempre sustrato de una sola de las dos actividades enzimáticas. La *metiltransferasa* modifica al DNA propio durante la replicación; su producto es, por tanto, un DNA de doble cadena que se ha metilado en una cadena. La actividad *endonucleasa* se estimula cuando en la célula aparece DNA no modificado, que representa el verdadero sustrato de esta actividad enzimática.

Endonucleasas de restricción. Las endonucleasas de restricción no sólo pueden estar codificadas por el cromosoma bacteriano, sino que también pueden estarlo por plásmidos y bacteriófagos. Los enzimas de restricción cortan DNA de doble cadena. Se distinguen varias clases: los enzimas de la clase I reconocen una determinada secuencia nucleotídica específica, pero cortan al DNA inespecíficamente fuera de la región de reconocimiento. A este grupo pertenece la endonucleasa de restricción del bacteriófago P1. Los enzimas de clase 2 se caracterizan porque el punto de corte está en el interior de la región de reconocimiento de la endonucleasa de restricción. Ello conduce a la formación de fragmentos definidos de DNA. Por esto, las endonucleasas de restricción de tipo 2 se utilizan en la técnica molecular de clonación (apartado 15.5).

En la tabla 15.4 se indican algunos representantes de las endonucleasas de restricción con corte específico. Algunos de estos enzimas reconocen un grupo de cuatro, otros de seis bases. Una determinada molécula de DNA se corta más frecuentemente en una secuencia de reconocimiento de cuatro bases que de seis bases; aparecen numerosos fragmentos pequeños. La secuencia de reconocimiento presenta una doble simetría de rotación, cuyo eje se indica mediante una línea discontinua (véase la Tab. 15.4). Esta estructura se denomina palindromo. Los puntos de corte son internos o externos al eje de simetría, tal como se indica mediante la flecha. En un corte asimétrico, p. ej. con *Eco*RI, se generan extremos monocatenarios de 4 bases. Un corte dentro del eje de simetría, p. ej. con *Hae*III conduce a la formación de los llamados extremos "romos". Se han aislado enzimas de restricción de cientos de microorganismos; muchos de ellos son asequibles comercialmente. Su denominación se

DE MADRID

Tab. 15.4 Selección de algunas endonucleasas de restricción.

Origen del enzima	Denominación de la *endonucleasa*	Secuencia de reconocimiento
Escherichia coli RY 13	*Eco*RI	5′ - G ↓ A - Ȧ - T - T - C - 3′ 3′ - C - T - T - Ȧ - A ↑ G - 5′
Haemophilus haemolyticus	*Hha*I	5′ - G - Ċ - G ↓ C - 3′ 3′ - C ↑ G - Ċ - G - 5′
Brevibacterium albidum	*Bal*I	5′ - T - G - G ↓ Ċ - C - A - 3′ 3′ - A - C - Ċ ↑ G - G - T - 5′
Haemophilus aegypticus	*Hae*III	5′ - G - G ↓ Ġ - C - 3′ 3′ - C - Ċ ↑ G - G - 5′

Las flechas indican los puntos de corte de las endonucleasas de restricción; las líneas discontinuas indican el eje de rotación de la secuencia de reconocimiento, y las estrellas los puntos de metilación.

basa en el organismo productor, a partir del cual se ha aislado (de ahí que se escriban en cursiva).

Mapas de restricción. Las moléculas de DNA cortadas en fragmentos de tamaños diversos con las endonucleasas de restricción pueden separarse fácilmente mediante una electroforesis en geles de agarosa, tal como se ha descrito en el apartado 15.3 (véase Fig. 15.22). La velocidad de migración de los fragmentos de DNA depende de su longitud: cuanto más pequeño sea el fragmento, más rápidamente migrará a través del gel; los fragmentos grandes penetran lentamente en el gel. El tamaño de los fragmentos de DNA puede determinarse por comparación con bandas de fragmentos de DNA de tamaño conocido. La ordenación de los puntos de corte de los enzimas puede establecerse por digestiones sucesivas del DNA y colocación de los extremos de los fragmentos superpuestos. Para poder obtener estos mapas de restricción únicamente resultan adecuadas aquellas *endonucleasas* que cortan en pocos puntos de la cadena y dan fragmentos relativamente grandes. Los enzimas de restricción que permiten cortar moléculas grandes de DNA en pequeños fragmentos están ganando importancia en la determinación de las secuencias de nucleótidos (véase apartado 15.5).

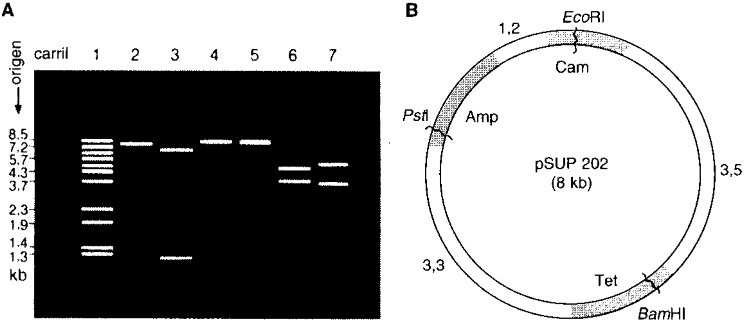


Fig. 15.22 Construcción de un mapa de restricción del vector de clonación pSUP202. A Electroforesis en gel de fragmentos generados por rotura del DNA de pSUP202 mediante los enzimas de restricción (2) *Pst*I, (4) *Eco*RI y (5) *Bam*HI, así como por digestiones dobles con *Pst*I/*Eco*RI (3), *Bam*HI/*Eco*RI (6) y *Bam*HI/*Pst*I (7). El carril I contiene DNA de λ como patrón de tamaños. La fluorescencia de los fragmentos se debe a la tinción con bromuro de etidio. **B** Ordenando los fragmentos que se solapan puede establecerse un mapa circular del plásmido a partir del patrón de bandas (**A**). Las cifras indican los tamaños en kilobases (kb) entre los puntos de restricción, que están localizados en los genes de resistencia a antibióticos para la ampicilina (Amp), cloranfenicol (Cam) y tetraciclina (Tc).

15.5 Técnica molecular de clonación

A principios de los años setenta se desarolló la técnica molecular de clonación. Se basa en los conocimientos adquiridos en la investigación básica del DNA y el RNA, de los enzimas implicados y de la transferencia genética mediante plásmidos y virus. La breve introducción a la técnica del DNA recombinante completa las explicaciones teóricas de los apartados anteriores 15.1 a 4.

Fragmentación del DNA y análisis de restricción. Con ayuda de las endonucleasas de restricción presentadas en el apartado 15.4 pueden fragmentarse las moléculas de DNA en fragmentos de pequeño tamaño fácilmente manipulables. Las *endonucleasas* son las herramientas elementales de la técnica de clonación. Un **patrón de fragmentos de restricción** tras la digestión con endonucleasas de DNA plasmídico se representa en la figura 15.22. Fragmentos de hasta 1000 pb pueden separarse en geles de poliacrilamida por electroforesis. Para separar fragmentos mayores (hasta unas 25 kb) hacen falta los geles de agarosa, una matriz con los poros mayores. La velocidad de migración de los fragmentos es inversamente proporcional al logaritmo del número de pares de bases en un rango de tamaños determinado. La suma de los tamaños de los fragmentos corresponde al tamaño de la molécula de partida. Utilizando diversas *endonucleasas* y posterior ordenamiento de los fragmentos solapados puede determinarse la posición de los puntos de corte, y así obtener un mapa físico de restricción de un determinado fragmento de DNA. Por electroforesis de campo pulsante ("pulse field electrophoresis") pueden obtenerse también de forma relativamente rápida mapas de cromosomas enteros. Si se busca en un patrón de fragmentos una secuencia determinada, cuya secuencia de nucleótidos sea complementaria de un fragmento de DNA aislado, lo que se hace es desnaturalizar el DNA después de separarlos por electroforesis, los fragmentos de una cadena se transfieren a una membrana de nitrocelulosa y por último se hibrida con una sonda de DNA marcada con el isótopo ^{32}P o con un colorante, de forma que únicamente se producen cadenas dobles en los fragmentos homólogos. Se reconocen como una señal específica en el autorradiograma o por la generación de color. Esta técnica se denomina **transferencia de Southern** ("Southern blotting").

Determinación de secuencias de nucleótidos. El disponer de fragmentos de restricción aceleró el desarrollo de métodos relativamente sencillos de **secuenciación del DNA.** De la secuencia de nucleótidos del DNA y siguiendo las reglas del codon, puede deducirse la secuencia de aminoácidos codificada. Se diferencian dos métodos para la secuenciación del DNA: (i) el método de la rotura química (**método de MAXAM y GILBERT**). Una molécula de DNA marcada en un extremo con ^{32}P se modifica en las cuatro bases mediante reactivos químicos, de modo que se separan de los restos de azúcar. El hueco así generado se convierte en un punto específico de rotura en el interior de la cadena de DNA. Debido a las roturas aparecen fragmentos de distintos tamaños. Éstos pueden separase por electroforesis en geles de poliacrilamida. Por comparación de los patrones de bandas en el autorradiograma que aparece tras tratar la muestra con agentes que atacan a la guanina, a guanina + adenina, timina + citosina, así como a la citosina, puede leerse la posición de cada base en la molécula de DNA. (ii) El **método didesoxinucleótidos según SANGER** se basa en una replicación dirigida enzimáticamente de la cadena de DNA y en

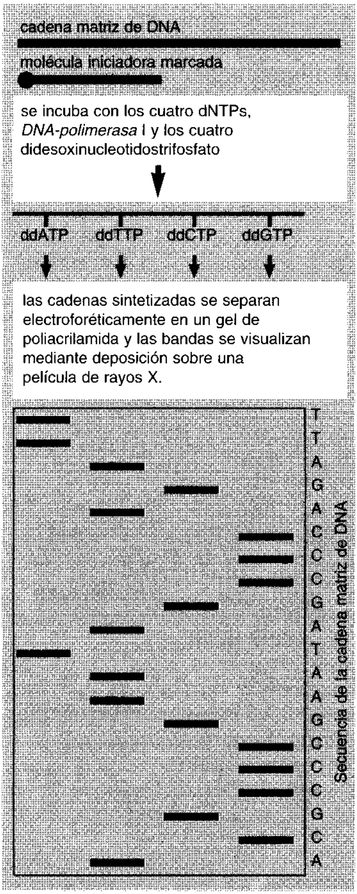

cadena matriz de DNA
molécula iniciadora marcada
se incuba con los cuatro dNTPs, *DNA-polimerasa* I y los cuatro didesoxinucleotidostrifosfato
ddATP
ddTTP
ddCTP
ddGTP
las cadenas sintetizadas se separan electroforéticamente en un gel de poliacrilamida y las bandas se visualizan mediante deposición sobre una película de rayos X.
T T A G A C C C G A T A A G C C C G C A
Secuencia de la cadena matriz de DNA

Fig. 15.23 Secuenciación del DNA según el método de los didesoxinucleótidos de SANGER. Véase texto.

una interrupción de la cadena. Partiendo de una molécula iniciadora (primer) corta y marcada radioactivamente (por lo general un oligonucleótido que se puede adquirir, comercial) se sintetiza la cadena complementaria a la matriz. Los elementos para ello son los trifosfatos de los cuatro didesoxirribonucleótidos (dNTPs). Se hacen cuatro reacciones distintas y a cada una se le añade uno de los cuatro análogos de bases 2',3'-didesoxinucleótidos (ddNTPs), cuya incorporación impide el crecimiento de la cadena por bloqueo, ya que no puede formarse un enlace fosfodiéster. Igual que en el método anterior, aquí también aparecen fragmentos de tamaños diversos, que pueden separarse por electroforesis en geles. En el patrón de bandas de los cuatro carriles puede leerse en el autorradiograma la secuencia de las bases (Fig. 15.23).

Construcción de una molécula recombinante de DNA. La técnica de clonación molecular utiliza plásmidos y virus como **vehículos** o **vectores** para introducir en células bacterianas DNA exógeno, incluso de origen eucariótico. Mientras que el DNA procariótico puede utilizarse directamente para clonación, el DNA de origen eucariótico hay que introducirlo en forma de DNAc. El DNAc contiene únicamente la parte codificada y se prepara a partir de la traducción inversa del RNAm mediante la *transcriptasa inversa*. La inclusión del DNA exógeno en las bacterias se consigue por lo general mediante transformación (pág. 517 y sig.). Las moléculas de DNA pueden introducirse igualmente en células animales y vegetales. La construcción de una molécula recombinante de DNA se indica en la figura 15.24 a modo de ejemplo. En primer lugar se cortan tanto el DNA del vector como el DNA exógeno con una *endonucleasa* específica, p. ej. *Eco*RI. En ambas moléculas se generan fragmentos lineales con extremos de una cadena, cuya secuencia de bases es complementaria ("extremos cohesivos"), en este caso AATT o bien TTAA. Si se mezcla el DNA plasmídico preparado de esta manera con el DNA exógeno se formarán puentes de hidrógeno entre los extremos complementarios de una cadena, y las discontinuidades se cierran covalentemente por adición de una *polinucleótido-ligasa*. Con este paso se completa la construcción de una molécula de DNA recombinante. El producto se denomina **DNA-híbrido** o DNA quimera.

Vectores. Un **vector de clonación** tiene que cumplir dos condiciones: sólo debe tener un punto de corte para la *endonucleasa* que se quiere utilizar, y debe tener una posibilidad de selección del DNA recombinante que contiene al DNA exógeno. Para la obtención de una genoteca (librería genómica) es recomendable una buena eficacia de captación del DNA exógeno por parte del vector. Especialmente apropiados para ello son mutantes del fago lambda (pág. 159). Un grupo de vectores derivados de él son los **cósmidos**, que pueden captar fragmentos de DNA de 35 a 40 kb. Los cósmidos son vectores obtenidos por inge-

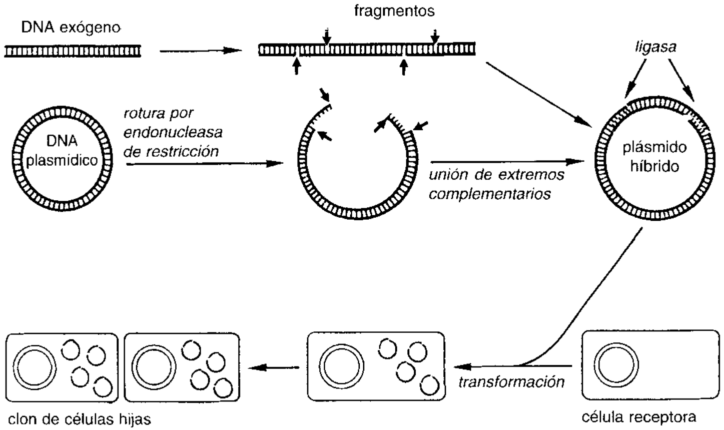

DNA exógeno
fragmentos
ligasa
DNA plasmidico
rotura por endonucleasa de restricción
unión de extremos complementarios
plásmido híbrido
transformación
clon de células hijas
célula receptora

Fig. 15.24 Representación simplificada del método de obtención de un DNA híbrido o "DNA-quimera" por inserción de un fragmento de DNA eucariótico en un plásmido bacteriano. El DNA exógeno y el plásmido se rompen *in vitro* mediante la misma *endonucleasa* de restricción. Así se forman fragmentos con extremos cohesivos (cadenas sencillas sobresalientes con bases complementarias). Por mezcla de las dos moléculas de DNA y tratamiento con *ligasa* se forman plásmidos con DNA eucariótico insertado. Estos DNA-quimera pueden introducirse en bacterias por transformación. Se multiplican por cultivos en masa de la bacteria. De este clon puede obtenerse DNA exógeno.

niería genética que poseen una función de replicación (p. ej. del plásmido pBR322), genes de resistencia a antibióticos (p. ej. el gen de resistencia a la tetraciclina) y los extremos cohesivos del fago lambda (el llamado sitio *cos*, "cos site"). Estos últimos son el punto de reconocimiento para el empaquetamiento del extracto de lambda. Sus actividades enzimáticas cortan de una cadena larga de copias de DNA, los llamados concatémeros, fragmentos de 45 kb de tamaño flanqueados por puntos *cos*, y los empaquetan en cabezas fágicas vacías; de este modo se favorece selectivamente la clonación de fragmentos grandes de DNA (Fig. 15.25).

El fago M13 ofrece otro sistema elegante de clonación. Es un virus filamentoso con una longitud de 900 nm y 9 nm de ancho. Infecta a *E. coli* a través del pilus sexual y en su multiplicación no mata al hospedador. El M13 se cuenta entre los virus DNA de una sola cadena (Tab. 4.1). Después de la infección se replica la cadena (+), y se sintetiza una forma replicativa intermedia (RF) compuesta por una cadena (+) y otra (–).

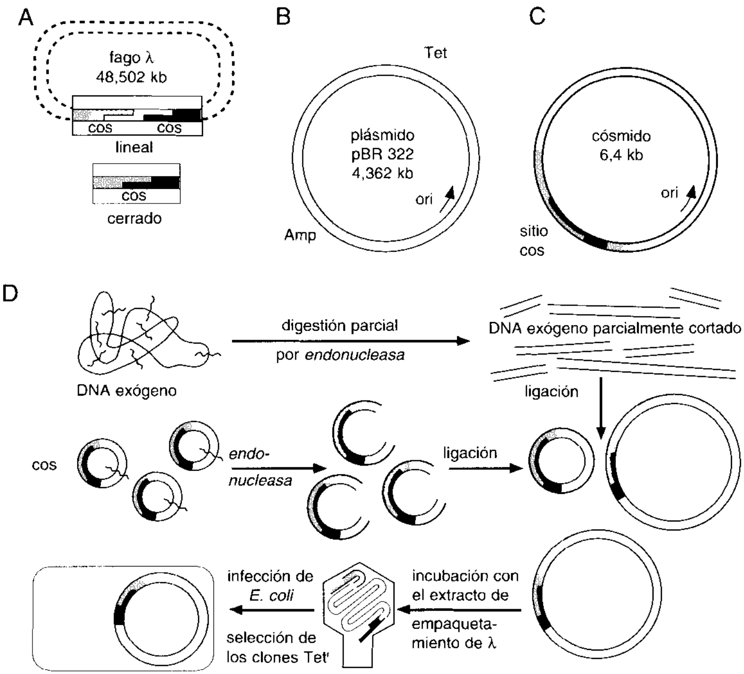

A
fago λ
48,502 kb
cos
cos
lineal
cos
cerrado
B
Tet
plásmido
pBR 322
4,362 kb
ori
Amp
C
cósmido
6,4 kb
ori
sitio
cos
D
digestión parcial
por endonucleasa
DNA exógeno
DNA exógeno parcialmente cortado
ligación
cos
endo-
nucleasa
ligación
infección de
E. coli
selección de
los clones Tet^r
incubación con
el extracto de
empaqueta-
miento de λ

Fig. 15.25 Cósmidos como vectores de clonación. A Los puntos cos (cohesive sites) son los extremos monocatenarios, complementarios, del cromosoma de lambda. **B** Como plásmido de clonación sirve pBR322, que lleva genes de resistencia frente a ampicilina (Amp) y tetraciclina (Tet). **C** El cósmido derivado de pBR322 tiene integradas las zonas cos. **D** Para la clonación se corta y liga el DNA exógeno y el cósmido. Mediante una incubación con el extracto de empaquetamiento de λ únicamente se cortarán en las zonas cos aquellos cósmidos híbridos que contengan un fragmento grande de DNA exógeno, entre 35 y 45 kb. Éstos se empaquetarán en cabezas de fago. Con el fago se infecta a *E. coli* y se seleccionan los clones Tet^r. Más explicaciones en el texto.

Únicamente se empaquetan las cadenas (+) en las partículas fágicas. La forma bicatenaria RF se comporta como un plásmido; se puede cortar con una *endonucleasa* y se puede recombinar con DNA exógeno. Por ligación del DNA extraño en ambas orientaciones pueden aislarse especies de DNA monocatenario después de la multiplicación del fago, cada una de las cuales lleva uno de los dos fragmentos de DNA recombinantes incorporados en la cadena (+). El vector M13 ha sido muy útil en los trabajos de secuenciación. Al proporcionar DNA de una sola cadena no es necesario el paso de desnaturalización del DNA; como el sitio de clonación es siempre único, puede partirse en la replicación del DNA de una molécula iniciadora universal (método de SANGER).

Selección de clones que lleven el DNA híbrido. Las células que llevan la molécula recombinante de DNA pueden seleccionarse por una característica fenotípica del vector o por una característica del gen clonado. La primera selección se basa en la inserción del DNA exógeno en un gen de resistencia a antibióticos del vector y esta resistencia se inactiva, p. ej. en el plásmido pBR322 (Fig. 15.25) se evita la resistencia frente a la tetraciclina o la ampicilina. Una bacteria con una molécula de DNA recombinante ha perdido una de las dos resistencias a antibióticos, a diferencia de las células que sólo han recibido el DNA del vector. Si hay que identificar un gen determinado en una genoteca hay que recurrir a otros mecanismos de identificación de los clones recombinantes: si se dispone de un fragmento de DNA homólogo (sonda genética) puede hacerse una prospección de la genoteca mediante el procedimiento de transferencia de SOUTHERN antes explicado. Si se conoce la función del gen clonado y se dispone de mutantes con un defecto en ese gen, pueden complementarse genéticamente estos mutantes por transferencia del DNA clonado. Por ejemplo, un mutante con una lesión en el gen de la biosíntesis de la leucina recupera la capacidad para crecer en un medio mineral sin la adición de leucina cuando se le introduce el gen silvestre correspondiente. No obstante, el DNA clonado no siempre da un producto génico funcional, sobre todo cuando el hospedador de la clonación –por lo general *E. coli*– no tiene ningún tipo de parentesco con el organismo dador del DNA. Si se forma el producto génico en el hospedador de clonación, pero es catalíticamente inactivo, puede reconocerse mediante anticuerpos específicos contra la proteína. El procedimiento puede realizarse también en colonias aisladas.

Expresión del DNA clonado. Para expresar **en bacterias** el DNAc clonado la secuencia de DNA implicada tiene que incorporarse en zonas del plásmido que se expresen fuertemente en el hospedador de clonación. Si por ejemplo, se recombina DNAc de la insulina con el gen de la ß-*lactamasa* o de la ß-*galactosidasa*, se construirá un polipéptido compuesto, una proteína de fusión. Se expresará bajo el control del promotor bacteriano correspondiente. La fuerza del promotor y la eficacia de traducción determinan la tasa de producción del producto génico recombinante. Por lo general se recomienda un alto rendimiento. No obstante, no es raro que la sobrexpresión de una proteína conduzca a efectos tóxicos acompañantes para el productor o a una degradación aumentada del producto deseado. Por ello, una expresión incontrolada (constitutiva) de los genes no vale la pena. Se construyeron vectores de expresión que poseen promotores muy fuertes para la clonación, pero regulables, p. ej. el promotor pL del fago lambda. Para este promotor se dispone de un sistema de regulación modificado genéticamente, que puede regularse mediante modificación de la temperatura. El represor que bloquea normalmente al promotor pL se inactiva por elevación de la temperatura. Por ello las células pueden cultivarse a bajas temperaturas en condiciones no tóxicas, y sintetizan la proteína exógena cuando se eleva la temperatura.

Para la introducción de DNA en **células animales** son especialmente útiles los vectores basados en retrovirus, y un promotor proveniente del gen de la metalotioneína permite una expresión proteica inducible por adición de cadmio. La metalotioneína rica en cisteína liga normalmente metales pesados y sirve de proteína protectora.

Para introducir genes en **células vegetales** se dispone como vectores de plásmidos Ti modificados (pág. 162 y sig.); se han utilizado con éxito por lo menos en dicotiledóneas. La transformación de protoplastos vegetales con DNA plasmídico por electroporación (pág. 518) parece muy prometedora, tanto para plantas mono- como dicotiledóneas.

Aplicaciones. La industria con orientación biotecnológica intenta utilizar comercialmente las posibilidades que ha abierto la investigación del DNA recombinante. El objetivo es producir productos biológicos de forma eficiente, puros y en grandes cantidades. Otro campo de aplicación que se practica con éxito desde finales de los años 70 es la producción de proteínas de aplicación terapéutica por tecnología genética. Entre ellas se cuentan **protohormonas** como la insulina humana, que se produce por bacterias o levaduras en grandes instalaciones de fermentación, hormonas del crecimiento como la hormona estimulante folicular, la endorfina como calmante y terapéuticos antitumorales como el factor necrótico de los tumores, las interleukinas o los interferones.

Los procedimientos usuales para la producción de **vacunas** son complicados y conllevan un riesgo. Así, por clonación del gen de la proteína de la envuelta del virus de la hepatitis B en bacterias se ha conseguido una vacuna de alta eficacia. De forma similar se han obtenido vacunas contra el herpes, la rabia y la glosopeda. En la actualidad se trabaja intensamente en el desarrollo de vacunas contra la malaria y otras enfermedades parasitarias, contra virus tumorales y contra el virus de la inmunodeficiencia adquirida (HIV). En enfermedades del corazón y circulatorias se emplean trombolíticos como la *uroquinasa* y activadores plasminogénicos tisulares específicos. Su producción conduce a un campo de aplicación de gran futuro para la ingeniería genética.

Mediante la "técnica de los hibridomas" pueden obtenerse células que producen anticuerpos monoclonales humanos. En ella se basa la esperanza de conseguir pronto combatir aquellas enfermedades infecciosas para las que no existe ningún quimioterapéutico, y eliminar células tumorales o los linfocitos T, que son los principales responsables del rechazo de los trasplantes.

Se discute activamente la aplicación de la ingeniería genética en seres humanos, para el análisis genómico, la terapia genética en células somáticas y para intervenir en las células germinales.

Los cultivos vegetales convencionales se han movido hasta ahora en los límites del potencial genético de los géneros de plantas que podían cruzarse y gracias a la técnica del DNA recombinante han visto enriquecida la variabilidad genética en el campo de la agricultura. Ahora es posible introducir nuevo material genético en las plantas de cultivo atravesando las barreras específicas, sin necesidad de experimentos de cultivo de varios años. Los objetivos principales de estos trabajos se encaminan a dotar plantas con resistencias frente a agentes perjudiciales, herbicidas e insectos, a elevar las tolerancias frente al estrés de la sequía, frío o concentraciones salinas, capacitarlas de una mejor utilización de los sustratos, como la luz o el nitrógeno, y comprobar su utilidad como productores de metabolitos vegetales secundarios, energía y materias primas. Esfuerzos análogos se encaminan a la aplicación de la ingeniería genética para incrementar la productividad en ganadería.

La utilización dirigida de microorganismos en el tratamiento de aguas residuales se practica ya desde el inicio de este siglo. En el campo del medio ambiente el ingeniero genético tiene un amplio campo de trabajo en el tratamiento de gases residuales, residuos urbanos e industriales, así como en la explotación de nuevas fuentes energéticas y materias primas. Pueden construirse microorganismos con nuevas capacidades metabólicas especiales y eficaces que enriquezcan y completen el potencial de los microorganismos de los que se dispone actualmente.

Aspectos de seguridad. Los procesos de recombinación de DNA y transferencia genética naturales determinan nuevas combinaciones de características genéticas, incluso entre genomas procarióticos y eucarióticos, tal como se señaló en el ejemplo de los tumores vegetales inducidos por el plásmido Ti. Lo nuevo de la tecnología genética es que permite combinar a gran escala de un modo dirigido, *in vitro*, genes de organismos no relacionados. Como las características del producto no pueden preverse hasta el más mínimo detalle, la ingeniería genética alberga un cierto riesgo potencial que los científicos sacaron a la luz pública (conferencia de Asilomar) y que hay que combatir cumpliendo unas normas. Este sistema voluntario de autocontrol supone la ordenación de los experimentos en diversas categorías de seguridad y la definición de las condiciones técnicas requeridas para ello. Esto implica tanto un equipamiento de laboratorios para los trabajos de ingeniería genética (que en Alemania tienen que estar registrados) como el empleo de cepas de especial seguridad, que no puedan sobrevivir en los hábitats naturales. Además, todos los microorganismos que llevan DNA recombinante hay que matarlos antes de su eliminación, para impedir su diseminación. La liberación de microorganismos manipulados genéticamente a los ambientes naturales requiere de un permiso especial.

Para manipular organismos patógenos existen desde hace tiempo medidas muy estrictas de seguridad. Después de 20 años de experiencia con experimentos de ingeniería genética puede afirmarse que los portadores de ácidos nucleicos recombinantes *in vitro* no tienen un potencial de riesgo mayor que las características de los organismos receptores, del vector de clonación y del DNA del dador. Desde junio de 1990 se ha completado en Alemania el autocontrol voluntario en el trabajo con nuevas combinaciones de DNA mediante la ley de "Regulación de la Ingeniería Genética".

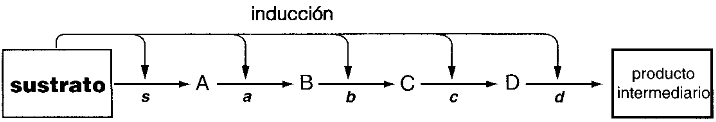
16. La regulación del metabolismo

En los capítulos precedentes referentes al metabolismo de los microorganismos hemos hablado en varias ocasiones de la regulación metabólica y del crecimiento por los factores mediales. La represión de la fermentación por el oxígeno atmosférico en las levaduras, descubierta ya por PASTEUR, es un ejemplo de una regulación metabólica enormemente considerada y estudiada. También se sabe desde hace tiempo que algunos de los enzimas utilizados para la degradación de los sustratos se sintetizan exclusivamente en presencia del sustrato correspondiente. Entre las bacterias desnitrificantes la respiración de los nitratos entra únicamente en funcionamiento cuando falta el oxígeno; el oxígeno reprime tanto la formación del sistema enzimático nitratorreductor como también su función. Modificaciones del pH en cultivos de *Enterobacter* o de *Clostridium* determinan el curso de la fermentación y la producción de los productos característicos. En las bacterias fototrofas el oxígeno y la luz influyen en la síntesis de los pigmentos. Éstas y otras muchas modificaciones determinadas por el medio se deben a unos mecanismos de regulación básicos.

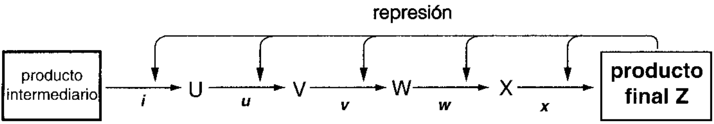
Los numerosos procesos metabólicos necesarios para la síntesis celular y para la reproducción requieren una coordinación óptima. Cada vía metabólica implica varias reacciones enzimáticas. El resultado de las vías metabólicas es la obtención de energía bioquímicamente útil, la síntesis de monómeros y de macromoléculas, así como la multiplicación de la célula. La supervivencia de un organismo a lo largo de la competencia que se establece entre ellos ha conducido a unos mecanismos que permiten por una parte la adaptación a condiciones ambientales variables y por otra, a coordinar de forma óptima el flujo de los metabolitos a través de las vías metabólicas. El objeto de estos procesos de optimización son las propias proteínas enzimáticas, su síntesis y su función. La regulación de las vías metabólicas tiene lugar a dos niveles: por una parte controlando la formación de enzima, por otra, modificando la actividad enzimática.

La regulación a nivel de la síntesis de enzima está extendida en numerosas vías del metabolismo. Por lo general la formación de varios enzimas que pertenezcan a la misma vía metabólica está regulada de forma conjunta. La regulación afecta a la velocidad de síntesis de los enzimas (tasa de síntesis) referida a la tasa de síntesis de las proteínas totales. La tasa está determinada por la frecuencia de la transcripción de los genes estructurales. Muchos enzimas se sintetizan siempre independientemente de las condiciones del medio, son componentes constitutivos de la célula; se habla entonces de **enzimas constitutivos**, genes constitutivos y síntesis enzimática constitutiva.

La **inducción enzimática** regula la formación de enzimas catabólicos. Desde el punto de vista de la economía del metabolismo parece lógico que los enzimas para la utilización de un nutriente y para la inclusión de sus productos de degradación en el metabolismo intermediario se sinteticen únicamente cuando el nutriente implicado se encuentre en el medio de cultivo. Todos los demás enzimas catabólicos, cuya síntesis puede ser regulada por la célula, no deberían producirse cuando no son necesarios.

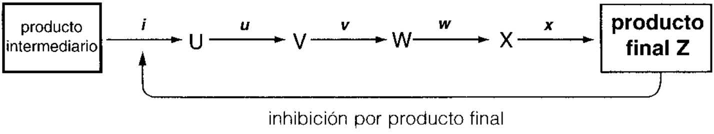

inducción
sustrato
s
A
a
B
b
C
c
D
d
producto intermediario

La **represión enzimática** regula la síntesis de los enzimas anabólicos. Desde el punto de vista de la economía metabólica no deberían sintetizarse aquellos enzimas de una cadena biosintética cuando el producto final correspondiente se encuentre en el medio de cultivo. La presencia o la acumulación de un producto final conduce en la represión a una disminución en la tasa de síntesis de todos aquellos enzimas de los componentes específicos de esa cadena biosintética.


represión
producto intermediario
i
U
u
V
v
W
w
X
x
producto final Z

Los enzimas para la síntesis de los monómeros se sintetizan normalmente siempre. Sin embargo, su formación queda reprimida cuando el producto final se encuentra en exceso. En este caso se habla de una **represión por el producto final**.

Los enzimas clave del metabolismo están sometidos por lo general a una **regulación a nivel de la actividad enzimática**. En un enzima de una vía sintética específica puede regularse la actividad catalítica; puede aumentarse (por un efector positivo) o disminuirse (por un efector negativo). En la **inhibición por producto final** ("feedback inhibition") el producto final actúa inhibiendo al primer enzima de una serie de reacciones.


producto intermediario
i
U
u
V
v
W
w
X
x
producto final Z
inhibición por producto final

Ambos tipos de regulación –la inducción y la represión por una parte, y la modificación de la actividad enzimática por otra– tienen consecuencias semejantes: modifican el flujo de metabolitos en una vía metabólica. La inducción y la represión actúan lentamente y se pueden considerar como mecanismos de regulación groseros. La modificación de la actividad de un enzima clave actúa inmediatamente; puede considerarse como una regulación fina.

16.1 Regulación de la síntesis enzimática

Muchas bacterias son capaces de crecer sobre un gran número de sustratos distintos. Esto presupone que son capaces de sintetizar los enzimas necesarios para la transformación de estos sustratos y por tanto, también de los genes estructurales correspondientes. Si en el medio de cultivo existe únicamente un sustrato se sintetizan los enzimas necesarios para la descomposición de este sustrato (catabolismo). Se habla de **inducción enzimática**, de un sustrato inductor y de enzimas inducibles. La formación de la mayoría de los enzimas implicados en el catabolismo de los sustratos está sometida a inducción.

La formación de los enzimas biosintéticos, los enzimas implicados por ejemplo, en la biosíntesis de las pirimidinas, las purinas y de los 20 aminoácidos, está regulada por **represión**. En la mayoría de los casos la señal que determina el cese de la síntesis proteica proviene del producto final de la vía biosintética (se habla de represión por el producto final).

Si en el medio de cultivo se encuentran simultáneamente dos sustratos, por lo general la bacteria utilizará primero a uno de ellos, a aquel que posibilite un crecimiento más rápido. Entonces la formación de los enzimas degradativos del otro sustrato queda reprimida; se habla de una **represión por catabolito**.

16.1.1 Inducción

Inducción de la *β-galactosidasa*. El ejemplo más profundamente estudiado de inducción enzimática es la utilización de la lactosa por *Escherichia coli* (Fig. 16.1). La lactosa es un disacárido que hay que hidrolizar antes de que entre en las vías de degradación de las hexosas:

$$\text{lactosa} + H_2O \xrightarrow{\beta\text{-}galactosidasa} \text{D-glucosa} + \text{D-galactosa}$$

Las células silvestres que crecen sobre glucosa contienen una actividad de la *β-galactosidasa* prácticamente no determinable. No obstante, si crecen

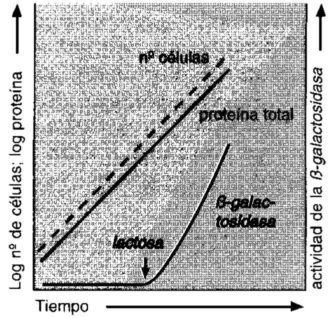


Fig. 16.1 Inducción de la formación de *β-galactosidasa*. Al añadir lactosa al medio de cultivo se inicia la síntesis de *β-galactosidasa*.

sobre lactosa u otro β-galactósido su actividad es 1000 veces superior; aproximadamente el 3% de la proteína total de la célula puede estar en forma de *β-galactosidasa*. Por lo general el enzima se sintetiza únicamente en presencia del sustrato inductor lactosa. El análisis de los mecanismos de regulación se facilitó bastante al utilizarse el inductor 2-propil-β-tiogalactósido que no es degradable. La adición de este tiogalactósido conduce a una inducción "gratuita" de la *β-galactosidasa*; se sintetiza el enzima sin que este compuesto inductor pueda ser hidrolizado y resulte asequible al catabolismo.

Inducción coordinada y secuencial. Consideremos la degradación de un sustrato A a través de varios compuestos intermediarios B, C, etc. y que los enzimas implicados sean *a*, *b*, *c*, ...

$$\mathrm{A} \xrightarrow[a]{} \mathrm{B} \xrightarrow[b]{} \mathrm{C} \xrightarrow[c]{} \mathrm{D} \xrightarrow[d]{} \mathrm{E} \xrightarrow[e]{} \mathrm{I}$$

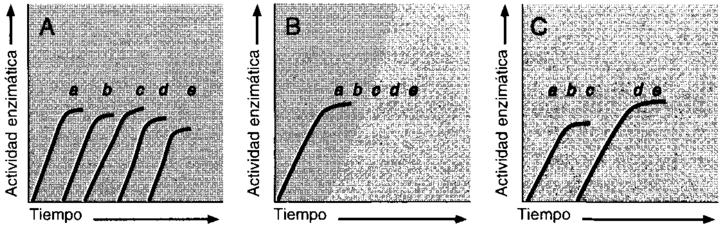
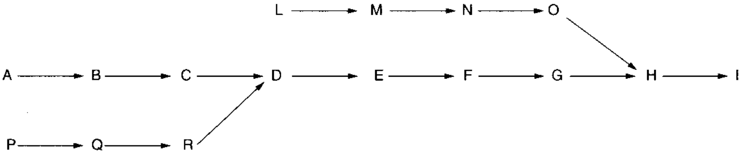


Fig. 16.2 Representación esquemática de la secuencia temporal de la aparición de enzimas inducibles. A Secuencial estricta, **B** coordinada estricta y **C** inducción secuencial de grupos enzimáticos regulados coordinadamente. En el tiempo 0 se añadió el sustrato inductor a células crecidas en condiciones de no inducción.

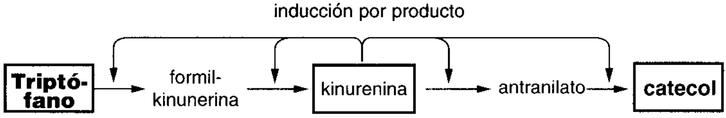
teóricamente existen **varias posibilidades** para la inducción de enzimas (Fig. 16.2): 1. La síntesis enzimática puede darse por pasos o ser secuencial: cada uno de los enzimas es inducido por el producto de la transformación anterior. 2. Todos los enzimas implicados se inducen de forma coordinada, esto es, A determina simultáneamente la síntesis de todos los enzimas *a* hasta *e*. 3. Los enzimas implicados en reacciones sucesivas (*a*, *b*, *c*) se inducen de forma coordinada y el último producto (D) u otro (C) de la primera serie induce a la síntesis de los enzimas de la serie siguiente (*d*, *e*).

La síntesis coordinada de todos los enzimas para la degradación del sustrato tiene la ventaja para la célula de poder reaccionar rápidamente frente a la oferta de ese sustrato. La inducción secuencial tiene como consecuencia que la transformación del sustrato y la tasa de crecimiento de las células aumentan tan sólo lentamente, ya que el producto de la primera reacción en la célula tiene que sobrepasar una concentración umbral para poner en funcionamiento la síntesis del segundo enzima. En la regulación de las vías degradativas convergentes ha de tener sentido que los enzimas implicados estén regulados por grupos coordinados, que estén inducidos a su vez por el producto del grupo que los precede.



El esquema de regulación en las vías degradativas convergentes se ha estudiado en los ejemplos de degradación del mandelato, 4-hidroxibenzoato y triptófano por *Pseudomonas putida*, *Acinetobacter calcoaceticus* y *Alcaligenes eutrophus*.

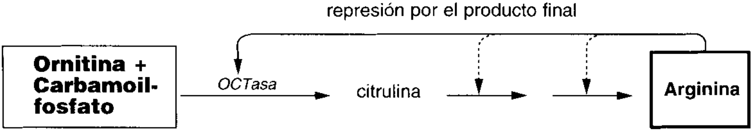
Inducción por el producto. Algunos enzimas degradativos se inducen por el producto de la primera reacción u otra subsiguiente de la vía degradativa. Éste es, por ejemplo, el caso de la degradación del triptófano. La vía discurre a partir del L-triptófano a través de la L-formilkinurenina, L-kinurenina y antranilato hasta el catecol. Los enzimas implicados están inducidos por la kinurenina.



Este tipo de inducción enzimática presupone la presencia de un nivel basal suficientemente alto de los enzimas implicados en la transformación del triptófano hasta kinurenina, para que la presencia de concentraciones elevadas del sustrato triptófano originen por lo menos trazas de kinurenina. La inducción por el producto en la vía de degradación del L-triptófano por la kinurenina puede considerarse como un mecanismo de protección de la célula que impida la inducción de los enzimas catabólicos por parte del triptófano sintetizado para la síntesis proteica. El triptófano es únicamente degradado cuando se encuentra en el medio de cultivo y en altas concentraciones dentro de la célula.

16.1.2 Represión

Represión por producto final. Consideremos el ejemplo de la síntesis de la arginina para ver cómo transcurre la represión determinada por un producto final sobre una vía biosintética en la concentración de los enzimas para esta síntesis (Fig. 16.3). La síntesis de la arginina parte del glutamato (Fig. 7.18) y conduce en último término a través de la ornitina, la citrulina y el argininosuccinato a arginina.



Si se deja crecer *Escherichia coli* sobre un medio mínimo y se determina como enzima representativo de la vía de síntesis de la arginina a la *ornitina-carbamoil-transferasa* (*OCTasa*) se encuentran concentraciones "normales" de este enzima. Si se añade arginina a este medio mínimo (20 µg/ml)

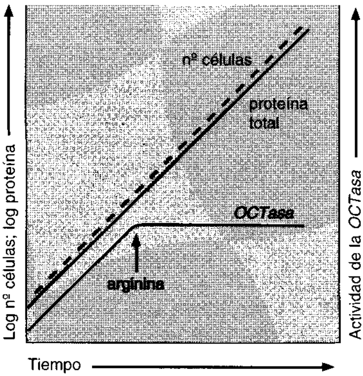


Fig. 16.3 Represión de la *ornitinacarbamoiltransferasa*. La formación de los enzimas necesarios para la biosíntesis de la arginina se impide casi instantáneamente cuando se añade arginina al medio de cultivo (se reprimen).

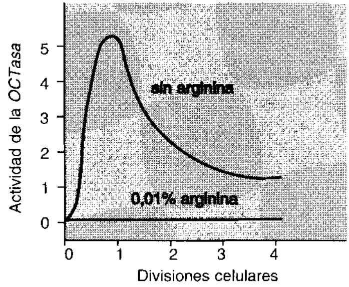


Fig. 16.4 Formación acelerada de la *ornitina-carbamoil-transferasa* por desrepresión del operón arginina. Células de *Escherichia coli* (tipo silvestre) crecieron en un medio mínimo que tenía arginina en exceso. Se lavaron las células y se suspendieron paralelamente en medio mínimo con y sin arginina, donde se incubaron. Se tomaron muestras a distintos tiempos y se determinó la densidad bacteriana y la actividad de enzimas representativos de la vía biosintética, como la *ornitina-carbamoil-transferasa.* Como puede verse, la actividad en ausencia de arginina aumenta al poco tiempo por encima del valor normal, y luego vuelve por dilución al valor normal al seguir el crecimiento. En presencia de arginina en el medio no se forma el enzima (de GORINI, L., W.K. MAAS: Biochim. Biophys. Acta 25 [1957] 208).

cesa inmediatamente su síntesis (represión). Durante el crecimiento en presencia de arginina el enzima se irá "diluyendo", esto es, la actividad específica de la *OCTasa* disminuye a un nivel muy bajo. Si por lavado se libera a estas células reprimidas de la presencia de arginina y se las resuspende en un medio mínimo sin arginina, tendrá lugar inmediatamente una desrepresión de la síntesis del enzima. La concentración del enzima alcanzará en poco tiempo un nivel varias veces superior al de la suspensión de partida (Fig. 16.4). Lentamente, cuando la función de los enzimas de la biosíntesis formados haya conducido a una acumulación de arginina en la célula, disminuirá la actividad específica de la *OCTasa* y volverá al nivel "normal".

Experimentos en quimiostatos con mutantes que presentaban lesiones en los enzimas implicados en la biosíntesis de la arginina permitieron demostrar que el estado desreprimido puede mantenerse: la limitación del crecimiento del mutante con arginina determinaba una actividad específica de la *OCTasa* 25 veces superior al valor "normal".

Modelo de regulación en vías biosintéticas ramificadas. La regulación de la formación de los enzimas implicados en vías biosintéticas ramificadas es muy compleja. La "familia de los aminoácidos aromáticos", la "familia del aspartato" y la "familia del piruvato" ofrecen unos ejemplos modelo (Fig. 7.18). Resulta claro que cada producto final únicamente puede reprimir la formación de los enzimas de su vía biosintética específica. Los enzimas anteriores al punto de ramificación están sometidos a represión por todos los productos finales, a una represión multivalente. Se reprimen únicamente cuando todos los productos finales están presentes en el medio de cultivo; adicionados aisladamente los productos finales no tienen ninguna acción.

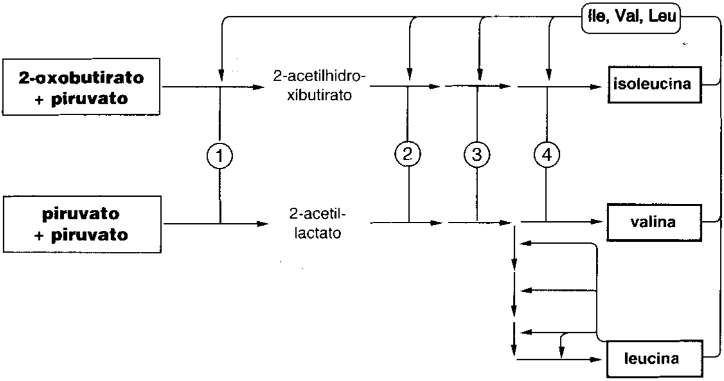

Ile, Val, Leu
2-oxobutirato + piruvato
piruvato + piruvato
2-acetilhidroxibutirato
2-acetil-lactato
①
②
③
④
isoleucina
valina
leucina

Fig. 16.5 Regulación de la biosíntesis de los enzimas conducentes a las vías biosintéticas de la L-isoleucina, L-valina y L-leucina por una represión multivalente (en este caso trivalente). Los enzimas *acetohidroxiácido-sintasa* (1), *acetohidroxiácido-isómero-reductasa* (2), *dihidroxiácido-deshidratasa* (3) y *transaminasa* (4) actúan tanto en la vía de la isoleucina como de la valina.

Una vía biosintética ramificada interesante bajo muchos puntos de vista es la vía de la L-isoleucina, L-leucina y L-valina. Cuatro de las reacciones que conducen del piruvato o del 2-oxobutirato hasta la valina o a la isoleucina están catalizadas por los mismos enzimas. Además, el 2-oxoiso-

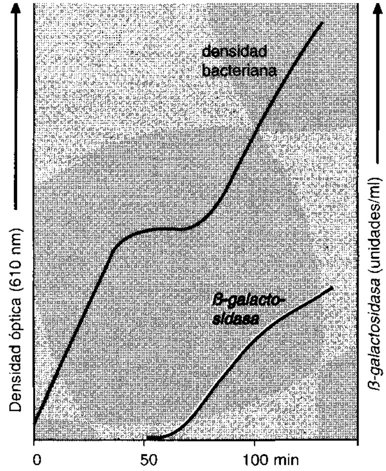


Fig. 16.6 "Efecto glucosa" o represión por catabolito. Formación retardada de *ß-galactosidasa* en *Escherichia coli*; al principio el medio de cultivo contenía 0,4 mg glucosa/ml y 2 mg lactosa/ml. Mientras haya glucosa disponible estará reprimida la formación de *ß-galactosidasa* (de EPSTEIN, W., S. NAONO y F. GROS: Biochem. Biophys. Res. Comm. 24 [1966] 588).

valerato (= 2-oxo-3-metilbutirato) es tanto un precursor de la valina como la sustancia de partida para la síntesis de la leucina (Fig. 16.5).

Represión por catabolito. Mientras que la represión por producto final afecta a la síntesis de los enzimas de las vías biosintéticas, la represión por catabolito se manifiesta en las vías degradativas. Si las células bacterianas tienen a su disposición en el medio de cultivo dos sustratos distintos, por lo general se prefiere aquel que posibilite un crecimiento más rápido. Se determina una represión de la síntesis de aquellos enzimas necesarios para la degradación del segundo sustrato (Fig. 16.6). El fenómeno de la represión por catabolito es la base de la conocida "diauxia" (Fig. 6.10). Las parejas glucosa y sorbosa, glucosa y lactosa o glucosa y acetato no son utilizadas simultáneamente por *Escherichia coli*, sino que se emplean sucesivamente. En primer lugar se emplea la glucosa; ésta reprime la formación de los enzimas para la degradación de cada una de sus parejas.

Más complicadas son las relaciones cuando un aminoácido se utiliza simultáneamente como fuente de energía, de carbono y de nitrógeno. La utilización de la histidina por la bacteria *Enterobacter aerogenes* ofrece un ejemplo muy claro de la influencia de la glucosa en el contenido en enzimas necesarios para la degradación de algunos aminoácidos. Como enzima catabólico representativo se midió el contenido de la célula en *histidasa* (Tab. 16.1). Si en el medio de cultivo se encontraba glucosa y nitrógeno en forma de amonio, no se sintetizaba la *histidasa*, incluso en presencia de histidina. La glucosa con los iones amonio reprime la síntesis de la *histidasa* casi totalmente. Si no había nitrógeno amoniacal como fuente adicional de N y por tanto las células necesitaban el nitrógeno de la histidina, la represión de la formación de *histidasa* determinada por la glucosa era menor. Este ejemplo demuestra que la deficiencia en nitrógeno puede suprimir parcialmente la represión por catabolito determinada por

Tab. 16.1 Contenido en *histidasa* en células de *Enterobacter aerogenes* después de crecer en distintos medios.

Adición al medio basal Glucosa	 L-histidina	 $(HN_4)_2SO_4$	*Histidasa* U cada 10 mg células
+	-	+	< 5
+	+	+	< 5
-	+	-	182
-	+	+	170
+	+	-	70

(de NEIDHART, F.C., B. MAGASANIK: J. Bacteriol. 73 [1957] 253).

la glucosa. La formación de un enzima catabólico, por tanto, no depende únicamente de la presencia de un inductor ni de la disponibilidad en cuanto a fuentes de energía, sino que también está controlada por la disponibilidad de nitrógeno en el medio.

Regulación de la concentración de enzimas de las vías metabólicas centrales. Los enzimas anfibólicos también pueden estar sometidos a una regulación genética. Las células de un crecimiento aeróbico de *Escherichia coli* tienen una elevada concentración en los enzimas del ciclo de los ácidos tricarboxílicos; en las células de un crecimiento anaeróbico su actividad específica es tan sólo de 1/10 a 1/20 de este valor, y la formación de la *2-oxoglutarato-deshidrogenasa* está totalmente reprimida. Algunos enzimas anapleróticos, como la *malato-sintasa*, *isocitrato-liasa* y la *glioxilato-carboligasa* se encuentran únicamente en células que requieran estos enzimas para la transformación del sustrato que tienen a su disposición.

16.1.3 Mecanismos de regulación

Teóricamente la síntesis de los enzimas podría realizarse tanto a nivel de la transcripción como a nivel de la traducción. Se ha establecido que en los procariotas la expresión de los genes está regulada predominantemente a nivel de la transcripción. La mayoría de los genes que codifican la estructura de una cadena polipeptídica son regulados, esto es, la transcripción de los genes estructurales está sometida a una regulación. Las condiciones mediales y la situación metabólica de la célula determinan el que se formen determinados enzimas o no, esto es, si deben transcribirse los genes correspondientes y con qué frecuencia.

Para ello deben llegar algunas señales del metabolismo al DNA. Estas sustancias indicadoras o **moléculas efectoras** son compuestos de bajo peso molecular como azúcares o sus derivados, aminoácidos o nucleótidos. Como estos efectores no pueden interaccionar directamente con el DNA existen unas **proteínas reguladoras** para cada uno de estos efectores. Si el efector se encuentra en elevada concentración en la célula modificará a través de una unión específica la conformación de la proteína reguladora y a través de ello su capacidad de unirse al DNA. Una proteína reguladora que se fija al DNA en ausencia del efector (**inductor**) se denomina **represor**. Una proteína reguladora que se fija al DNA en presencia del efector (**correpresor**) se denomina **aporrepresor**.

Las regiones a las que se fijan las proteínas reguladoras en el DNA no son los propios genes estructurales, sino regiones inmediatamente próximas; se conocen como promotor y operador. El **promotor** representa una secuencia de bases reconocible por la *RNA-polimerasa* DNA dependiente; es el punto de unión de la *RNA-polimerasa* y el punto de iniciación de la transcripción. Los genes que no están sometidos en su expresión a una regulación van ligados también a un promotor. Los promotores de genes regulables pueden modificar sus características de iniciación por unión con proteínas reguladoras. El **operador** es una secuencia de bases situada entre el promotor y los genes estructurales y reacciona igualmente con una proteína reguladora, el represor. Este último determina que se dé o no la transcripción. El conjunto promotor, operador y genes estructurales representan un **operón**. Se denomina operón a un grupo de genes funcionalmente relacionados.

Las proteínas determinadas por los genes de un operón son por lo general enzimas que catalizan varios pasos de una vía metabólica. La transcripción de un operón conduce a la síntesis de una única molécula de RNAm (policistrónica).

Los responsables de la síntesis de las proteínas reguladoras son **genes reguladores**, que aparentemente son constitutivos. Pueden estar en las proximidades del operón, aunque no necesariamente.

Parece ser que únicamente la **RNA-polimerasa-holoenzima** completa es capaz de fijarse correctamente al promotor. La *RNA-polimerasa* está compuesta por las subunidades α, β, β', σ y ω. En ausencia del factor sigma (σ) fácilmente disociable, el enzima sigue disponiendo de su actividad catalítica completa, pero no de su capacidad para fijarse al fragmento de DNA específico para ella, al promotor. El factor de transcripción sigma cumple aparentemente con una función importante en la fijación específica de la *polimerasa* al DNA.

Para la finalización (terminación) de la síntesis del RNAm al final de un operón o de un gen aislado parece ser que existe igualmente una región del DNA específica responsable, el **terminador**. Aún no está claro el papel que tiene un factor de terminación rho (ρ), una proteína tetramérica, en la separación de la *RNA-polimerasa* del DNA.

En contraposición al RNAt y al RNAr, el RNAm es lábil y de vida breve; su vida media supone únicamente unos pocos minutos (de 0,5 a 5). Por tanto, la frecuencia de la transcripción es la única que determina la concentración de RNAm en la célula. Por su parte la concentración de RNAm determina la concentración de la proteína enzimática por él codificada.

Se diferencia entre operones inducibles y reprimibles. Los operones responsables de la degradación de la lactosa, la galactosa y la arabinosa son **inducibles**, esto es, la frecuencia máxima de transcripción se alcanza únicamente cuando los efectores externos –lactosa, galactosa, arabinosa– están presentes en el medio de cultivo. Se habla también de los efectores externos como de inductores externos. La formación de los enzimas de operones inducibles se desencadena por **inducción**. Por el contrario, los operones responsables de la síntesis de arginina, histidina o triptófano son **reprimibles**, esto es, la frecuencia máxima de transcripción se alcanza

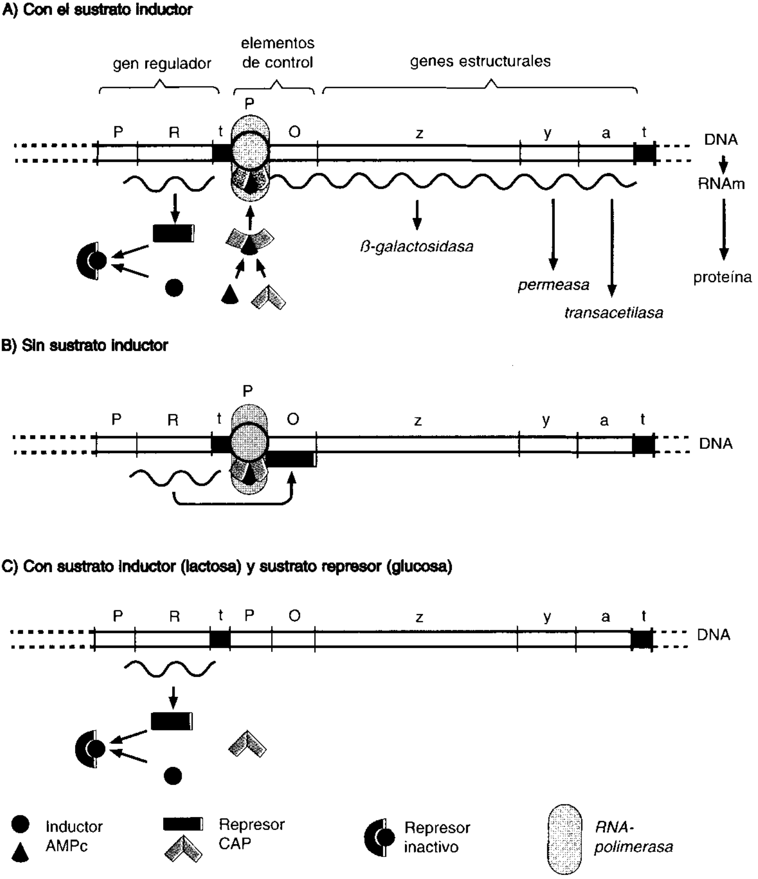

A) Con el sustrato inductor
gen regulador
elementos de control
genes estructurales
P
P
R
t
O
z
y
a
t
DNA
RNAm
β-galactosidasa
permeasa
transacetilasa
proteína
B) Sin sustrato inductor
P
P
R
t
O
z
y
a
t
DNA
C) Con sustrato inductor (lactosa) y sustrato represor (glucosa)
P
R
t
P
O
z
y
a
t
DNA
Inductor
AMPc
Represor
CAP
Represor inactivo
RNA-polimerasa

Fig. 16.7 Modelo de regulación del operón lactosa, sometido tanto a inducción como a represión por catabolito. Para la transcripción del operón se requiere la unión del CAP al promotor. El CAP se une solamente en presencia de AMPc. La glucosa inhibe la unión del AMPc y con ello la transcripción del operón *lac*.

únicamente cuando los efectores de bajo peso molecular correspondientes –arginina, histidina, triptófano– no están presentes en la célula o se encuentran por debajo de las concentraciones umbral críticas.

Se habla de los efectores como correpresores y de las proteínas reguladoras correspondientes como proteínas represoras o aporrepresores. La formación de los enzimas de un operón reprimible se desencadena por **desrepresión**.

Inducción del operón lactosa (control negativo). El operón lactosa (*lac*) de *Escherichia coli* abarca al promotor *lac*, al operador *lac* y a los genes estructurales para los tres enzimas β-*galactosidasa*, *permeasa* y *transacetilasa* (Fig. 16.7). Este operón se ha estudiado en todos sus detalles; se ha podido aislar el DNA; se han determinado las secuencias de bases de las regiones promotora y operadora; se han aislado y analizado las proteínas reguladoras.

El operón está sometido a un **control negativo**, esto es, la proteína reguladora (represor *lac*) permanece fija sobre el operador e impide la transcripción, siempre que no se halle presente ningún inductor. Como inductor externo actúa la lactosa (α-D-galactosil-β-1,4-D-glucosa). Es transportada al interior de la célula mediante una *permeasa* y se transforma en una alolactosa (α-D-galactosil-β-1,6-D-glucosa) que actúa como inductor (interno). La transformación hasta alolactosa está catalizada por la *β-galactosidasa*. Ambos enzimas, la *permeasa* y la *β-galactosidasa* están presentes también en células no inducidas pero en concentraciones algo inferiores a una milésima de las células totalmente inducidas. La fijación de la alolactosa determina una modificación en la conformación del represor *lac*, de forma que disminuye su afinidad por el DNA operador. El represor *lac* cargado deja así libre al operón para ser transcrito.

El operón *lac* está sometido a un segundo control, a un **control positivo**, esto es, la transcripción tiene lugar sólo cuando una segunda proteína reguladora (CRP o CAP) se fija al promotor. Las siglas CAP (= **C**atabolite **A**ctivator **P**rotein) y CRP (= **C**yclic AMP **R**eceptor **P**rotein) son sinónimos. La fijación del CRP es una premisa indispensable para la propia fijación de la *RNA-polimerasa* al DNA.

La afinidad necesaria para que el CRP se fije al DNA promotor se establece únicamente cuando el AMP cíclico (AMPc) se encuentra en una concentración suficiente en el interior de la célula.

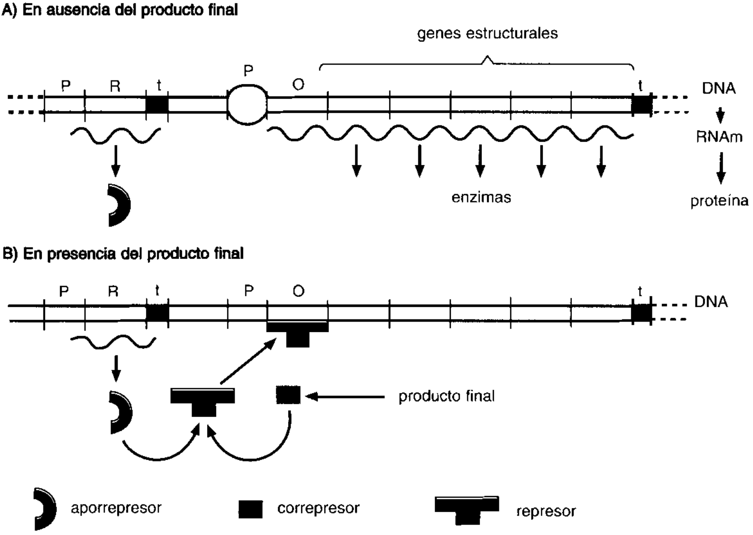
Represión por catabolito del operón lactosa. Cuando el medio de cultivo sobre el que se desarrolla *Escherichia coli* contiene lactosa y glucosa se reprime la formación de los enzimas del operón *lac* (Fig. 16.6 y 16.7). Este "efecto glucosa" se debe a que la presencia de la glucosa determina concentraciones intracelulares de AMPc bajas. Esta represión por catabolito determinada por la glucosa (fructosa o glucosa-6-fosfato) actúa sobre otras vías inducibles degradativas (para la arabinosa, la galactosa, el sorbitol y la glicerina entre otros).

La disminución de la concentración en AMPc por la glucosa se debe probablemente a la localización del enzima formador del AMPc. El AMPc se forma en la célula a través de una *adenilato-ciclasa* a partir del ATP:

$$\text{ATP} \xrightarrow{\textit{adenilato-ciclasa}} \text{AMPc} + \text{PPi}$$

Este enzima está ligado a la membrana. Su actividad es alta cuando el sistema HPr del transporte de azúcares está en su forma fosforilada. Baja cuando los azúcares han de ser transportados por fosforilación y el sistema HPr consume mucha energía.

Inducción del operón arabinosa (control positivo). El operón arabinosa (*ara*) de *E. coli* se regula como un operón positivo al igual que el de la ramnosa y el de la maltosa. Implica a los genes estructurales *ara*B, *ara*A


A) En ausencia del producto final

B) En presencia del producto final

Fig. 16.8 Modelo de regulación de la formación de enzimas biosintéticos mediante represión por producto final. En ausencia de producto final tiene lugar la síntesis de los enzimas. El represor activo, que cierra al operador ("represor activado") se forma por unión del producto final o correpresor con el aporrepresor.

y *ara*D para la transformación enzimática de la L-arabinosa a la D-xilulosa-5-fosfato. La expresión del operón está inducida por la arabinosa. Al igual que otros muchos sistemas degradativos el operón está sometido a una regulación a nivel del promotor, sobre el que se fija el CAP activado por el AMPc. Además el operón dispone de otras dos regiones de control, el operador y un iniciador. Al operador se fija una proteína reguladora codificada por el gen *ara*C. Esta proteína actúa como represor e impide la transcripción al unirse al operador. En presencia de arabinosa esta proteína se convierte en activador, se fija al promotor y posibilita así la transcripción. Por tanto, el operador está sometido tanto a un control negativo como a otro positivo mediante una proteína reguladora específica.

Represión por producto final del operón triptófano. El operón triptófano de *E. coli* abarca a los genes estructurales para los cinco enzimas implicados en la transformación del corismato hasta triptófano, además de un operador y un promotor al inicio del operón. Aquí no hace falta que consideremos a otro promotor menos activo localizado entre los genes estructurales. La función del operón, aclarada en todos sus detalles, corresponde totalmente al modelo propuesto en 1961 por JACOB y MONOD acerca de la función de un operón reprimible, tal como se representa en la figura 16.8. El gen regulador *trp*R distante del operón determina una proteína efectora, el aporrepresor. En presencia del correpresor triptófano, que tiene una elevada afinidad hacia la proteína aporrepresora, el represor impide la expresión del operón. Una disminución en la concentración de triptófano conduce entonces nuevamente a la liberación del operón y a la síntesis del RNAm.

Regulación autógena. Este concepto se aplica a sistemas de regulación en los que el producto de un gen localizado en un operón adquiere la función de una proteína reguladora. El principio de la regulación autógena se basa en que la proteína reguladora determina la expresión del operón y por tanto la de su propia síntesis. Es indiferente el que el operón esté sometido a un control positivo o negativo.

El sistema regulado de esta forma mejor conocido es el de la utilización de la histidina por *Salmonella*. La degradación de la histidina hasta glutamato, iones amonio y formamida está catalizada por cuatro enzimas cuyos genes estructurales (genes *hut*) son adyacentes. Su expresión está sometida a control por una proteína represora. El gen que codifica esta proteína represora se localiza entre los genes estructurales y por tanto es un componente del operón. El operón *hut* se induce por el primer producto de la vía degradativa, el urocanato (inducción por producto). Como consecuencia la inducción del operón no conduce tan sólo a la formación de los enzimas degradadores de la histidina, sino también a una acumulación de la proteína represora. Esta última determina de nuevo una transcripción reducida de los genes *hut*, incluyendo al gen regulador. La regulación autógena permite un control muy suave y equilibrado de la formación de enzimas. Este tipo de sistemas autorregulados están muy extendidos entre las bacterias, los eucariotas y los bacteriófagos.

Regulación de la síntesis del RNAr y del RNAt. Mientras que la síntesis de RNAm está regulada por inducción, represión y represión por catabolito, la regulación de la síntesis de los RNA estables es muy diferente. Tal como se sabe desde hace tiempo, las cepas silvestres de *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium* y *Bacillus subtilis* reaccionan de una forma brusca frente a una deficiencia en un aminoácido. Las células detienen momentáneamente sus síntesis, no sólo de las proteínas sino también del RNA. Esta dependencia estricta ("stringent") en cuanto a la presencia de los componentes de las proteínas, los aminoácidos, pone de manifiesto que la síntesis de los RNA estables no depende únicamente de la presencia de sus componentes, los nucleótidos. El aislamiento de mutantes por inserción que no están regulados de una forma estricta sino relajada ("relaxed") y que forman RNA incluso en ausencia de algún aminoácido, ha puesto de manifiesto que por lo menos en la regulación participa un gen (*rel*A). Mientras que la falta de un aminoácido en las células silvestres conduce a la acumulación de nucleótidos poco usuales (ppGpp y pppGpp), en los mutantes no sucede esto. Probablemente se trata de los nucleótidos que actúan como señales conduciendo a la detención de la síntesis del RNAr y del RNAt.

16.2 Regulación por modificación de la actividad catalítica del enzima

Anteriormente habíamos planteado la posibilidad de que dispone la célula de controlar la concentración intracelular del enzima adaptándola a las necesidades metabólicas. A través de una nueva formación o de una dilución del enzima durante el crecimiento puede ir adaptándose la célula a las nuevas condiciones del medio modificadas. Por modificación de la actividad catalítica de los enzimas se consigue una adaptación considerablemente más rápida frente a situaciones metabólicas que representen modificaciones drásticas.

16.2.1 Mecanismos de regulación

La velocidad de una transformación catalizada enzimáticamente, que se mide como cantidad de producto por unidad de tiempo (por lo general, μmoles de sustrato transformado/min) no depende tan sólo de la concen-

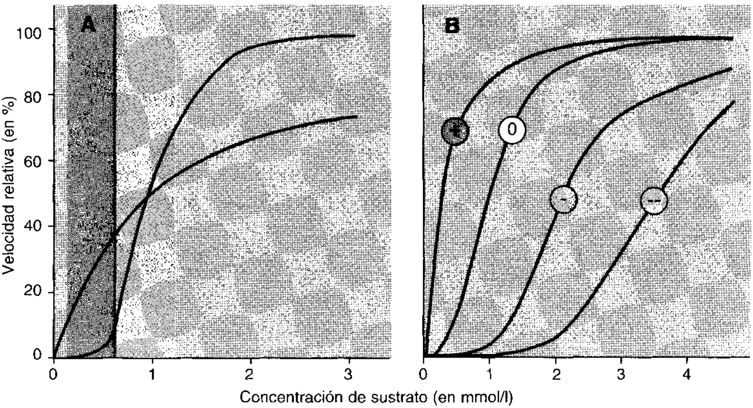


Fig. 16.9 Curvas de saturación de sustrato de enzimas "hiperbólicos" y "sigmoidales". A Curva de saturación de sustrato de un enzima "hiperbólico" (negro) y un enzima "sigmoidal" (rojo). **B** Mediante efectores pueden modificarse las curvas de saturación de sutrato: por efectores positivos (+) a favor de una mayor afinidad, por efectores negativos (–) a favor de una afinidad inferior del enzima por el sustrato. Los campos marcados de gris y rojo indican las zonas de mayor sensibilidad

tración de enzima (E) y del sustrato (S) o del producto (P) sino que también depende de la afinidad del enzima hacia el sustrato (K_{m}) y de su velocidad máxima ($V_{\text{máx}}$). La K_{m} es la llamada constante de MICHAELIS-MENTEN; indica la concentración de sustrato para la que la actividad enzimática tiene una velocidad semimáxima ($V_{\text{máx}}/2$). El enzima tiene una velocidad máxima cuando el sustrato se encuentra en exceso y, por tanto, el enzima está saturato de sustrato. K_{m} y $V_{\text{máx}}$ son parámetros de la cinética enzimática.

Enzimas sencillos. La mayoría de los enzimas se caracterizan por tener una curva de saturación hiperbólica. La velocidad de reacción depende únicamente de la concentración del sustrato y del producto, y aumenta hiperbólicamente a medida que se incrementa la concentración de sustrato, obedeciendo por tanto a la relación de MICHAELIS-MENTEN. A este conjunto de enzimas caracterizados por curvas de saturación hiperbólicas se les denomina también enzimas sencillos o "hiperbólicos" (véase Fig. 16.9A, curva negra).

Resulta plausible que un enzima transforme más rápidamente al sustrato cuando su concentración vaya aumentando que cuando disminuye. La sensibilidad con la que un enzima reacciona frente a las modificaciones en la concentración de sustrato depende de la pendiente de la curva de saturación de sustrato. Cuanto más pendiente sea la curva más se modificará la velocidad de transformación con una pequeña modificación en la concentración de sustrato. Tal como se ve en la figura 16.9A la pendiente es máxima para concentraciones bajas de sustrato, y a sensibilidad máxima. Esta consideración permite comprender que la velocidad del flujo de sustancias o metabolitos en la célula depende de su concentración. Por lo general los sustratos de los enzimas (metabolitos) se encuentran en la célula en concentraciones por debajo del valor K_m.

Enzimas reguladores. Los enzimas reguladores tienen características considerablemente más complicadas que los enzimas sencillos. La mayoría de ellos se caracterizan por curvas de saturación de sustrato que difieren de las curvas hiperbólicas y frecuentemente son sigmoidales (Fig. 16.9 A y B). Las curvas sigmoidales de saturación presentan una zona con una pendiente significativamente superior al de las curvas de saturación de los enzimas sencillos. En esta zona entre aproximadamente 1/2 y 1 1/4 de K_m son muy sensibles, esto es, pequeñas modificaciones en la concentración de sustrato son suficientes para modificar intensamente la velocidad de transformación.

Las curvas sigmoidales indican que el enzima está formado por subunidades entre las que se establecen unas **interacciones cooperativas**. La unión del sustrato al centro catalítico de una unidad aumenta claramente la afinidad de los otros puntos de unión al sustrato en la misma molécula enzimática. Efectivamente, los enzimas reguladores están constituidos por dos o más, generalmente cuatro, subunidades.

Los enzimas reguladores disponen además del centro catalítico que reconocen y fijan al sustrato, de otros centros estereospecíficos, llamados **centros alostéricos**. Son los lugares de unión de los **efectores** que modifican la afinidad hacia el sustrato por parte del enzima. Existen lugares de unión para efectores positivos (activadores) y otros para efectores negativos (inhibidores). Los efectores modifican la sigmoidalidad del enzima (véase Fig. 16.9B). No se habla tan sólo de centros alostéricos, sino también de **enzimas alostéricos**, inhibición alostérica y efectores alostéricos, y frecuentemente se utilizan los términos "enzima alostérico", "enzima regulador" y "enzima sigmoidal" como sinónimos.

El grado de cooperación se expresa mediante el coeficiente de cooperación (o coeficiente de HILL) n. Indica el número de lugares de unión interdependientes, esto es, el número de subunidades que reaccionan entre sí de forma cooperativa. $n = 1$ cuando no existe cooperatividad. Para enzimas alostéricos que consten de cuatro subunidades se obtienen valores de $n > 1$ y < 4 según la medida de la cooperatividad positiva. En el caso de que la cooperatividad sea negativa n es < 1. Existen además sistemas más complejos que aquí no podemos tratar.

Modelos de cooperatividad. La cooperatividad entre las subunidades enzimáticas que se pone de manifiesto en la sigmoidalidad de las curvas de saturación de sustrato intenta explicarse mediante dos hipótesis: el modelo de simetría (MONOD, WYMAN, CHANGEAUX) y el modelo secuencial (KOSHLAND). Ambos modelos están representados esquemáticamente en la figura 16.10.

Ambos modelos se basan en que los enzimas pueden presentarse en diversas formas: una forma activa (con elevada afinidad por el sustrato) y otra inactiva (con baja afinidad por el sustrato). La relación en que se encuentren entre sí las diversas formas depende de la presencia y la concentración de los ligandos (moléculas sustrato, activadores e inhibidores). Los modelos se diferencian en cuanto a la suposición de cómo tiene lugar esta modificación en la conformación.

Según el **modelo de simetría** el enzima se encuentra únicamente en dos estados conformacionales posibles entre los que se establece un equilibrio dinámico. Todas las subunidades de una molécula enzimática tienen la misma conformación; no existe ningún estado intermedio, sino tan sólo oligómeros simétricos (Fig. 16.11). El equilibrio se caracteriza por la constante alostérica *L*. En ausencia de ligandos predomina por lo general el estado basal inactivo (estado T, "tenso") sobre el estado activo R ("relajado"). Si se añaden los ligandos, éstos reaccionan con las moléculas enzimáticas que se encuentran en los estados conformacionales correspondientes: los inhibidores con las moléculas en el estado T, los sustratos y activadores con moléculas enzimáticas en el estado R. Por unión del sustrato el enzima se mantiene permanentemente en el estado R. Para mantener el equilibrio entre los dos estados conformacionales han de transformarse otras moléculas enzimáticas al estado R.

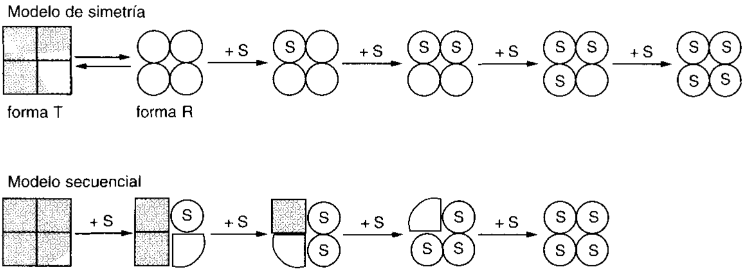


Fig. 16.10 Modelo de simetría y modelo secuencial de los enzimas alostéricos. La representación hace referencia a un enzima que consta de cuatro subunidades idénticas.

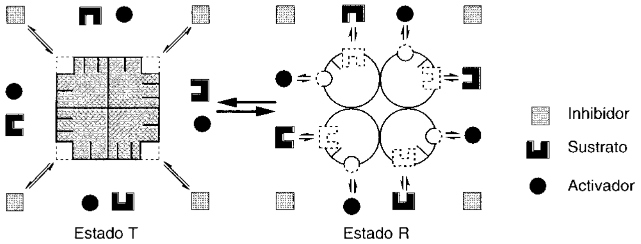


Fig. 16.11 Representación del tipo de equilibrio entre el estado de baja actividad catalítica y el estado de alta actividad de un enzima alostérico compuesto por cuatro subunidades según el modelo de simetría. Aclaraciones en el texto, (según Kirschner, K.: Ergebn. Mikrobiol. 44 [1968] 123).

Como cada molécula enzimática dispone de varios lugares de fijación del sustrato basta un pequeño número de moléculas sustrato para transformar un número múltiple de lugares de fijación del sustrato al estado de alta actividad catalítica. Se facilita así la unión de otras moléculas sustrato. En esto se basa el efecto cooperativo, que tiene como consecuencia la dependencia sigmoidal de la velocidad de reacción con respecto a la concentración del sustrato. Un efector negativo tiene la acción inversa.

Según el **modelo secuencial** se supone que el enzima adopta su conformación catalíticamente activa cuando interactúa con su sustrato (fig. 16.10). En un enzima constituido por varias subunidades la modificación en la conformación provocada en una subunidad por el sustrato se transmite secuencialmente a las otras subunidades y facilita en cada una de ellas la fijación de una nueva molécula sustrato. Pueden presentarse por tanto oligómeros asimétricos, en la figura tetrámeros, con subunidades que tengan distintas conformaciones. La presencia de activadores favorece la transformación a la forma activa, los efectores negativos la dificultan.

Enzimas alostéricos y efectores. Los enzimas reguladores se encuentran por lo general en todas las vías biosintéticas y en algunas vías degradativas. En la mayoría de los casos los enzimas regulados alostéricamente se encuentran al principio de una vía biosintética específica y asumen una posición clave.

Los efectores alostéricos son siempre compuestos de bajo peso molecular, y son productos finales de vías biosintéticas o bien sustancias cuya concentración refleje la situación metabólica de la célula, como por ejemplo ATP, ADP, AMP, acetil-CoA, fosfoenolpiruvato y $NADH_2$.

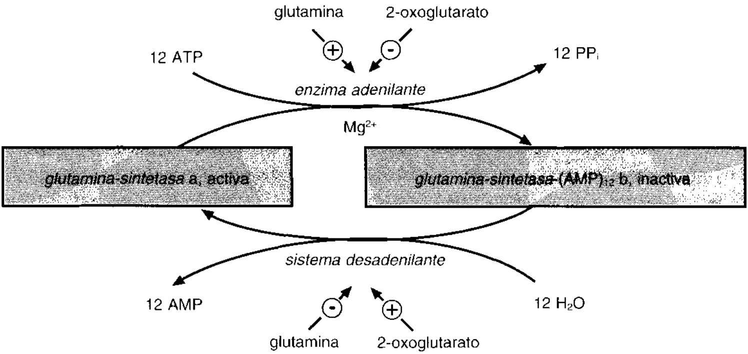

glutamina
2-oxoglutarato
+
−
12 ATP
12 PPᵢ
enzima adenilante
Mg²⁺
glutamina-sintetasa a, activa
glutamina-sintetasa-(AMP)₁₂ b, inactiva
sistema desadenilante
12 AMP
12 H₂O
−
+
glutamina
2-oxoglutarato

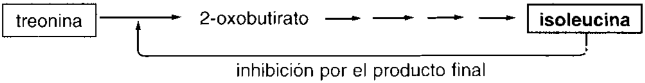
Fig. 16.12 Regulación de la *glutamina-sintetasa* de *Escherichia coli* por modificación química catalizada enzimáticamente. + = efector positivo (estimulación); – = efector negativo (inhibición) (según Holzer, H. y W. Duntze: Ann. Rev. Biochem. 40 [1971] 345).

Modificación de la actividad enzimática por modificación covalente. Un pequeño número de enzimas actúa según un mecanismo de regulación distinto: algunos enzimas pueden modificarse por vía enzimática. Esta modificación puede conducir tanto a un incremento como a una disminución de la actividad enzimática. Puede consistir en una adenilación, una fosforilación o una acetilación. Se trata de un proceso de actuación relativamente rápido.

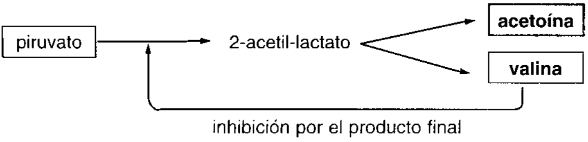
En los mamíferos los enzimas *fosforilasa* y *glucógeno-sintetasa* degradadores del glucógeno son activados o inactivados por mediación de la acción enzimática. En *Escherichia coli* la formación de la *glutamina-sintetasa* no sólo se reprime, sino que la actividad del enzima ya presente puede disminuir entre un 80-90% en el intervalo de pocos minutos cuando se añaden iones amonio a un medio de cultivo que anteriormente no lo contenía. Esta disminución de la actividad enzimática se debe a una modificación química catalizada por enzimas sobre la forma activa del enzima (*glutamina-sintetasa* a) por adenilación a *glutamina-sintetasa* b (véase Fig. 16.12). La presencia de glutamina en la célula estimula el enzima adenilante; el 2-oxoglutarato libre la inhibe. Si se eliminan los iones NH_4^+ del medio de cultivo tiene lugar una deficiencia en glutamina, y la *glutamina-sintetasa* vuelve a reactivarse, con liberación de los grupos de ácido adenílico (AMP) mediante un sistema desadenilante.

16.2.2 Modelos especiales de regulación

Vías biosintéticas. Por lo general el primer enzima específico de una vía biosintética es regulable. Está sometido a la inhibición por el producto final (inhibición por producto final o "feed-back inhibition"). Si tiene lugar una sobreproducción y acumulación del producto final en la célula, éste determinará por inhibición del primer enzima de la vía biosintética inmediatamente una disminución del flujo de metabolitos. La *treonina-desaminasa* es un enzima de este tipo en la vía de la síntesis de la isoleucina a partir de la treonina:



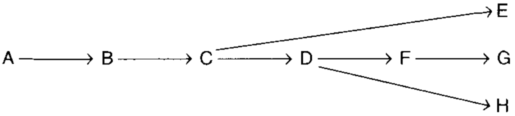
Enzimas isofuncionales controlados y no controlados. Debemos indicar que no todas las *treonina-desaminasas* tienen que ser inhibibles por la isoleucina. Si *Escherichia coli* crece aeróbicamente sobre glucosa y sales de amonio, únicamente se presenta una *treonina-desaminasa*. La posibilidad de ser inhibido alostéricamente por la isoleucina indica la función anabólica de este enzima. Si por el contrario las células crecen anaeróbicamente sobre una mezcla de aminoácidos (peptona y casaminoácidos) la *treonina-desaminasa* anabólica queda reprimida y se sintetiza un isoenzima, que tiene una función catabólica y está sometido en último término a una regulación alostérica por el AMP y el ADP. Otro ejemplo lo ofrece la formación de 2-acetil-lactato por *Enterobacter aerogenes*. La reacción catalizada por la *acetohidroxiácido-sintasa* tiene por una parte un papel en la fermentación anaeróbica de la glucosa hasta acetoína (catabolismo); por otra parte conduce la reacción de la síntesis de valina (anabolismo); así, el 2-acetil-lactato es un producto intermediario común de una vía metabólica ramificada:



Las células pueden formar dos enzimas isofuncionales. Un enzima se produce únicamente cuando durante la fermentación baja el pH y la acetoína se forma como un producto de fermentación neutro. El otro enzima se sintetiza también en un medio neutro o ligeramente alcalino, tiene un óptimo de pH alto y es inhibido alostéricamente por la valina.

Tal como indican estos ejemplos, la influencia mutua de dos vías biosintéticas puede evitarse por formación de enzimas isofuncionales, siendo uno por lo general regulado de una forma estricta, mientras que el otro es regulado por otra vía.

Vías biosintéticas ramificadas. Si el primer paso de una vía biosintética es común a dos o más productos finales se plantean unos problemas especiales. En una sucesión de reacciones hipotética que conduzca A hasta E, G y H la transformación inicial A ⟶ B quedaría inhibida cuando uno solo de los productos finales (p. ej. H) se acumulase. Sin embargo así también se disminuiría la síntesis de G y E. Estas complicaciones en la regulación de las vías biosintéticas ramificadas parecen haberlas resuelto los distintos organismos por mecanismos diversos. Hasta ahora se han encontrado varios tipos de regulación de la función enzimática en las vías metabólicas divergentes o paralelas: 1. El primer paso está catalizado por varios enzimas isofuncionales, cada uno de los cuales está regulado por un producto final distinto. 2. El primer paso está catalizado únicamente por un enzima y a) para su inhibición hacen falta todos los productos finales en exceso (inhibición concertada) o b) cada producto final participa de forma paritaria en la inhibición (inhibición acumulativa) de modo que la inhibición total puede superar a la suma de las inhibiciones parciales (inhibición cooperativa).



La síntesis de los aminoácidos metionina, lisina, treonina e isoleucina ("familia del aspartato") se inicia por **enzimas isofuncionales** (véase la Fig. 16.13).

Para que se realice la reacción

aspartato + ATP ⟶ aspartato-4-fosfato + ADP

Escherichia coli dispone de tres *aspartato-quinasas* paralelas, cuyas actividades son reguladas por distintos productos finales. *Aspartato-quinasa* I y la *homoserina-deshidrogenasa* I son inhibidas por la treonina. La *aspartatoquinasa* III está regulada por la lisina. La *aspartato-quinasa* II no está regulada alostéricamente. El control de las *aspartato-quinasas* se completa por controles secundarios de forma que el primer enzima específico de cada una de las vías divergentes está sometido a una inhibición por producto final.

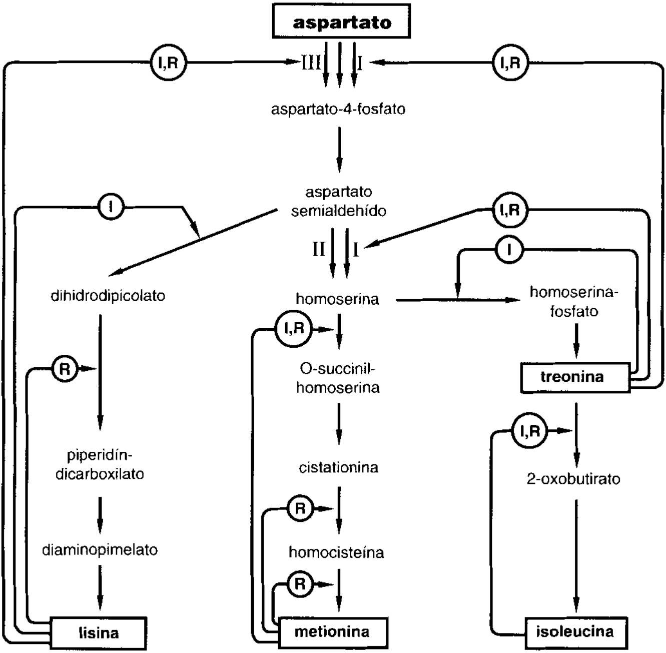

aspartato
I,R
III
I
I,R
aspartato-4-fosfato
aspartato semialdehído
I
I,R
II
I
I
dihidrodipicolato
homoserina
homoserina-fosfato
I,R
R
O-succinil-homoserina
treonina
I,R
piperidín-dicarboxilato
cistationina
2-oxobutirato
R
diaminopimelato
homocisteína
R
lisina
metionina
isoleucina

Fig. 16.13 Regulación de la biosíntesis de aminoácidos de la "familia del aspartato" en *Escherichia coli.* Las líneas rojas indican las reacciones enzimáticas sometidas a una inhibición por producto final (I). Para algunos enzimas se ha demostrado también una represión por producto final (R).

Un modelo de regulación semejante al indicado anteriormente se encuentra en la "familia de los aminoácidos aromáticos" (Fig. 7.18). La síntesis de los aminoácidos aromáticos fenilalanina, tirosina, triptófano y 4-aminobenzoato se inicia con la transformación de la eritrosa-4-fosfato y fosfoenolpiruvato hasta 3-desoxi-D-arabinoheptulosa-7-fosfato (DAHP). En *E. coli* se encuentran tres *DAHP-sintasas*. Una es inhibida por la tirosina y otra por la fenilalanina; la tercera es un enzima muy poco activo que no es inhibido. Otros lazos de retroinhibición ("feedback-loops") aseguran controles secundarios.

Fosfofructoquinasa y efecto PASTEUR. El efecto PASTEUR de la inhibición de la glucolisis por la respiración se explicó con la suposición de que la cadena respiratoria y la fosforilación a nivel de sustrato compiten por el ADP y el fosfato (véase pág. 297). Según han demostrado investigaciones recientes la degradación de la hexosa a través de la vía de la fructosabifosfato se regula en primer lugar alostéricamente a través de la *fosfofructoquinasa* (véase Fig. 16.14).

La *fosfofructoquinasa* de la levadura de panadería es inhibida alostéricamente por el ATP. El ATP eleva la sigmoidalidad de la curva de saturación de sustrato. Resulta chocante e indicativo el hecho de que los 5'-trifosfatos de inosina, guanosina y citidina puedan actuar como dadores de fosfato en lugar del ATP, pero ninguno de ellos tiene una acción inhibidora o reguladora. Esto significa que el centro alostérico tiene una elevada especificidad por el ATP y que la señal es significativa. Frente a ello, la especificidad del centro catalítico es baja. El AMP actúa como un efector positivo y elimina la inhibición determinada por el ATP. Otros mono- y difosfatos no tienen ninguna acción o es muy escasa. En *Escherichia*

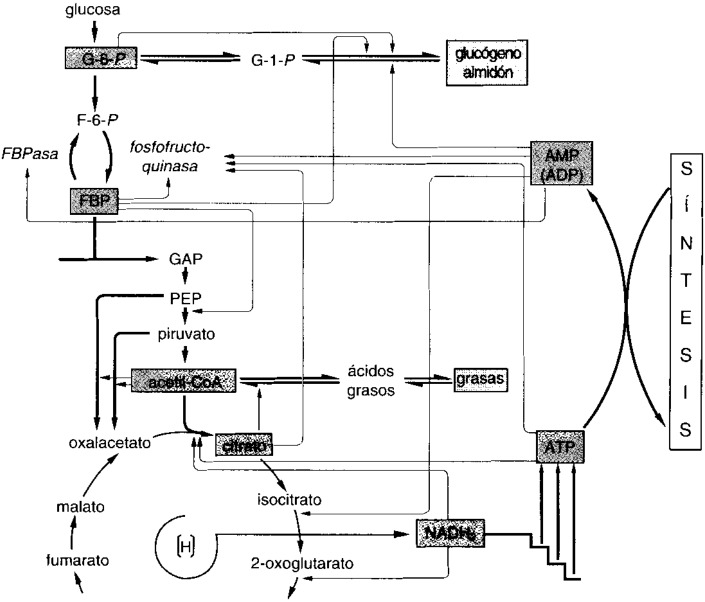

glucosa
G-6-P
G-1-P
glucógeno almidón
F-6-P
FBPasa
fosfofructo-quinasa
FBP
AMP (ADP)
S Í N T E S I S
GAP
PEP
piruvato
acetil-CoA
ácidos grasos
grasas
oxalacetato
citrato
ATP
malato
isocitrato
fumarato
[H]
NADH₂
2-oxoglutarato

Fig. 16.14 Esquema de alguna de las interrelaciones entre enzimas y metabolitos implicados en la degradación de las hexosas y la síntesis de reservas. En el esquema se han combinado descubrimientos relevantes en levaduras, tejidos animales y bacterias. Los metabolitos con funciones importantes como efectores se han enmarcado en rojo. Las flechas delgadas negras que parten de ellos indican funciones positivas como efectores, y las rojas funciones negativas.

coli no actúa el AMP, sino el ADP como efector positivo. La *fosfofructoquinasa* es inhibida también por el citrato. En este caso el ATP refuerza la inhibición y la fructosa-6-fosfato la disminuye.

El conocimiento de las propiedades alostéricas de la *fosfofructoquinasa* permite la siguiente suposición: cuando células de levaduras o de tejidos crecidos aeróbicamente quedan sin oxígeno y por tanto se interrumpe la fosforilación en el transporte de electrones, desciende la relación entre las concentraciones de ATP y AMP en la célula con lo cual aumenta la actividad del enzima y se incrementa el flujo de metabolitos. El que esta regulación se dé de hecho en la célula viva del modo descrito se ha podido determinar midiendo las concentraciones intracelulares de glucosa, glucosa-6-fosfato, fructosa-6-fosfato, fructosa-1,6-bifosfato y triosasfosfato antes y después de transferir las células de condiciones anaeróbicas a aeróbicas. Inmediatamente después de la aireación de las células aumenta la concentración de glucosa-6-fosfato y de fructosa-6-fosfato y disminuyen drásticamente las concentraciones de fructosabifosfato y triosasfosfato. La *fosfofructoquinasa* actúa por tanto como una válvula regulada por adenilatos y otros metabolitos: si se cierra, se acumulan los metabolitos situados por encima de la válvula, mientras que los situados por debajo siguen siendo transformados y disminuyen. Así se comprende la disminución del flujo de glucosa cuando se pasa a condiciones aeróbicas.

Gluconeogénesis. Los adenilatos ATP, ADP, AMP y los derivados del acil-CoA actúan de forma reguladora en varias reacciones de la degradación de las hexosas, del metabolismo intermediario y de la síntesis de reservas. La regulación de la *fosfofructoquinasa* responde aparentemente a la válvula principal por la que se rige el flujo de sustrato en la vía de la fructosa-bifosfato. El enzima equivalente que controla la degradación a través de la vía del 2-ceto-3-desoxi-6-fosfogluconato es aparentemente en algunas bacterias la *glucosa-6-fosfato-deshidrogenasa*. Ésta también es inhibida marcadamente por el ATP y el $NADH_2$.

La síntesis de la glucosa (gluconeogénesis) a partir del piruvato o del lactato tiene un papel importante cuando éstas y otras sustancias actúan como fuentes de carbono y faltan hidratos de carbono. La síntesis discurre a través de las reacciones de la vía de la fructosabifosfato con excepción de tres, que son irreversibles (Fig. 16.14). Estos pasos están catalizados por enzimas regulables. En los tejidos animales existe una vía que conduce del piruvato hasta el fosfoenolpiruvato a través del oxalacetato. Este paso está catalizado por la *piruvato-carboxilasa* y es dependiente de la presencia de acetil-CoA. Aparentemente el acetil-CoA actúa aquí como señal de la saturación de todas las reacciones que consumen acetil-CoA, sobre todo de la oxidación terminal por el ciclo de los ácidos tricarboxílicos. Esta regulación garantiza la ganancia de energía y permite una síntesis de glucosa únicamente cuando hay un exceso de acetil-CoA. En segundo lugar la dependencia de la formación de oxalacetato por el acetil-CoA para completar el ciclo de los ácidos tricarboxílicos por suministros de oxalacetato debe ser también de importancia.

La segunda reacción irreversible de la degradación de la glucosa se evita en la gluconeogénesis por la *fructosa-1,6-bifosfatasa*:

$$\text{fructosa-1,6-bifosfato} + H_2O \longrightarrow \text{fructosa-6-fosfato} + P_i$$

Este enzima es inhibido por el AMP. El AMP actúa aquí como indicador del grado de saturación de la célula con compuestos ricos en energía. Un exceso en AMP indica que no hay suficientes suministros de ATP para saturar las reacciones que consumen energía. Parece plausible que bajo estas condiciones la gluconeogénesis debe frenarse en favor de la degradación de la glucosa para una mayor ganancia energética.

Ciclo de los ácidos tricarboxílicos. En las levaduras el ATP disminuye intensamente la afinidad de la *citrato-sintasa* por el acetil-CoA. En *E. coli* y otras bacterias una concentración alta en $NADH_2$ constituye la señal de que la cadena respiratoria está saturada y de que debe disminuirse el flujo a lo largo del ciclo de los ácidos tricarboxílicos. La *2-oxolutarato-deshidrogenasa*, la *citrato-sintasa* y la *piruvato-deshidrogenasa* están sometidas a inhibición por el $NADH_2$ (Fig. 16.14).

Síntesis de grasas de reserva. Por lo general se acumulan sustancias de reserva cuando las fuentes de carbono y de energía están en exceso, pero también cuando hay una deficiencia en compuestos nitrogenados o sulfurados y el crecimiento no es posible. La señal para la síntesis de grasas (ácidos grasos) y polisacáridos parte predominantemente de productos intermediarios. En las levaduras la reacción limitante en la velocidad de la síntesis de los ácidos grasos es la carboxilación del acetil-CoA por la *acetil-CoA-carboxilasa*.

$$\text{acetil-CoA} + CO_2 \xrightarrow[\text{biotina-enzima}]{\text{ATP}} \text{malonil-CoA}$$

Este enzima es el primero en la vía biosintética de los ácidos grasos de cadena larga; otras síntesis que parten del acetil-CoA (síntesis de carotenoides, esteroides, citrato, malato, etc.) no requieren ninguna activación por formación de malonil-CoA. La *acetil-CoA-carboxilasa* es activada por el citrato. Un nivel elevado de citrato favorece, por tanto, a través de la síntesis de malonil-CoA la producción de ácidos grasos de cadena larga y de grasas (triglicéridos). Como contrapartida y efectores negativos actúan los compuestos con el CoA del ácido palmítico y otros ácidos grasos. Cuando se acumulan derivados del CoA tiene lugar una inhibición por producto final.

Síntesis de polisacáridos de reserva. La síntesis de glucógeno y almidón se realiza a partir de la glucosa-l-fosfato. Ésta se activa por el nucleósido-trifosfato (NuTP) y es transferido a una cadena de glucosas:

$$\text{glucosa-l-fosfato} + \text{NuTP} \xrightarrow{\textit{pirofosforilasa}} \text{NuDP-glucosa} + \text{PPi}$$

$$n\ \text{NuDP-glucosa} \xrightarrow{\textit{glucógeno-sintetasa}} (\text{glucosa})_n + n\ \text{NuDP}$$

Mientras que la **síntesis del glucógeno** tiene lugar en el riñón a través de la UDP-glucosa, en la síntesis de almidón de las plantas verdes y en la síntesis de glucógeno de distintas bacterias participa la ADP-glucosa. La *glucógeno-sintetasa* del hígado es activada por la glucosa-6-fosfato. Los sistemas de regulación en las bacterias y en los vegetales se diferencian significativamente de los del hígado. La regulación afecta aquí a la *pirofosforilasa*. En *Escherichia coli*, *Arthrobacter*, *Rhodospirillum rubrum* y en las hojas de espinaca el AMP y el ADP actúan inhibiendo y los pasos previos (glucosa-l-fosfato), estimulando. La *pirofosforilasa* de *E. coli* es activada por la fructosabifosfato, la glicerinaldehídofosfato y el fosfoenolpiruvato, el enzima de *R. rubrum* se activa por el piruvato y el enzima de las hojas de espinaca por el 3-fosfoglicerato, fosfoenolpiruvato y la fructosabifosfato. La síntesis de polisacáridos ofrece un ejemplo bonito de cómo el mismo efecto puede conseguirse a través de distintos sistemas de regulación.

Fijación autotrófica del anhídrido carbónico. La fijación del anhídrido carbónico a través del ciclo de la ribulosa-1,5-bifosfato es uno de los procesos que consumen más energía en el metabolismo. Resulta por tanto claro que existan mecanismos de control que determinen que el ciclo actúe a su velocidad máxima cuando la célula tenga asegurado el flujo de energía necesario (síntesis de mono- y polímeros, renovación de enzimas entre otros). La *fosforribuloquinasa* está sometida a una regulación lógica: el enzima es inhibido por el AMP (en raras ocasiones por el ADP) y se activa por el $NADH_2$.

Estado energético de la célula. Los ejemplos anteriormente indicados confirman la suposición de que los adenilatos realizan importantes funciones de control en la célula y que hasta cierto punto representan señales comunes del catabolismo y el anabolismo, con cuya ayuda se acompasan las velocidades de la ganancia de energía y de la biosíntesis. El contenido de la célula en ATP, ADP y AMP o, expresado de una forma más específica, las relaciones entre estos adenilatos, son las que deciden con qué velocidad se desarrollarán las reacciones aisladas y por tanto el conjunto de la vía de degradación o de biosíntesis.

Para el "estado de carga energética" de la célula se ha desarrollado una ecuación cuantitativa. El estado de carga energética ("energy charge" = E.C.) viene indicado por la expresión

$$\mathrm{E.C.} = 1/2 \cdot \frac{2\,\mathrm{ATP} + \mathrm{ADP}}{\mathrm{ATP} + \mathrm{ADP} + \mathrm{AMP}} = \frac{\mathrm{ATP} + 0{,}5\,\mathrm{ADP}}{\mathrm{ATP} + \mathrm{ADP} + \mathrm{AMP}}$$

El factor 0,5 se ha incluido arbitrariamente para que el parámetro oscile entre 0 y 1. Por tanto, el estado de carga energética indica cuántos "enlaces ricos en energía" están presentes referidos al número total de unidades de adenosina. El parámetro vale 1 cuando todos los adenilatos están en forma de ATP y vale 0 cuando sólo se presenta el AMP. En células en crecimiento exponencial el valor de E.C. es generalmente 0,8.

Los resultados que se han obtenido en las investigaciones permiten suponer que los enzimas alostéricos están activados o inhibidos por uno u otro adenilato y que así se consigue regular armónicamente el conjunto del metabolismo celular. Si aumenta la carga energética de la célula por ejemplo, la actividad de los enzimas catabólicos disminuye y aumenta la de los enzimas sintéticos. Si disminuye el E.C. los enzimas reaccionan de forma inversa.

16.3 Mutantes defectivos en la regulación

La aclaración de la regulación de la síntesis enzimática y de su actividad se debe al aislamiento de mutantes con regulación defectuosa. Se han aislado, y se aíslan, mutantes que, por ejemplo: 1. no sintetizan proteínas represoras funcionales o que las contienen en una concentración varias veces superior; 2. mutantes con el operador constitutivo, cuya proteína represora no puede fijarse al operador; 3. mutantes alostéricamente insensibles, cuyo enzima alostérico no reconoce al efector. Para contestar a la cuestión de cómo se aíslan estos mutantes damos a continuación algunos procedimientos básicos.

Mutantes con enzimas catabólicos constitutivos. Los mutantes que sintetizan de forma constitutiva los enzimas implicados en el catabolismo pueden enriquecerse por una **alternancia de sustrato** frecuente. Si una célula sintetiza constitutivamente los enzimas necesarios para la utilización del sustrato A, crecerá a velocidad máxima cuando se la transfiera del sustrato B al A, mientras que las células silvestres inducibles necesitan un período de latencia para que se sinteticen los enzimas catabólicos para el sustrato A. Al cabo de varias generaciones se transfieren las células de nuevo al sustrato B y se las deja crecer hasta que el enzima A se haya diluido suficientemente. Repitiendo varias veces este proceso se consigue que los mutantes constitutivos predominen con respecto a las células salvajes inducibles. De este modo se han conseguido, por ejemplo, mutantes constitutivos para los enzimas de la lactosa en *Escherichia coli*. Otros mecanismos de selección emplean la acción de análogos estructurales del sustrato que inhiben la inducción. Por ejemplo, el tiometilgalactósido impide en *Escherichia coli* la inducción del operón *gal* por la galactosa.

Mutantes con enzimas biosintéticos constitutivos. Pueden conseguirse mutantes que sinteticen constitutivamente los enzimas implicados en el anabolismo o que tengan una regulación biosintética fina defectuosa empleando el **método del antimetabolito**. Muchos análogos estructurales o antimetabolitos (pág. 224) de los productos finales de las cadenas biosintéticas (aminoácidos, pirimidinas, entre otros) actúan como bacteriostáticos, ya que por una parte imitan al producto final e impiden la biosíntesis del metabolito normal y por otra, se incorporan en los ácidos nucleicos y las proteínas, conduciendo entonces a macromoléculas no funcionales. Como consecuencia de una inhibición por un pseudoproducto final cesa el crecimiento. Si se siembra sobre una placa de agar una población de células silvestres (10^8–10^{10} células) que contiene un antimetabolito, únicamente crecerán unos pocos mutantes resistentes y formarán colonias.

Esta **resistencia frente al antimetabolito** puede deberse a varias mutaciones en las características fisiológicas de las células: 1. Mutación a "insensibilidad alostérica"; esta mutación tiene como consecuencia que la actividad del primer enzima específico (alostérico) no disminuye ni por el metabolito ni por el antimetabolito, y el producto final de la cadena biosintética se sintetiza de forma incontrolada. 2. Mutación a una "desrepresión constitutiva"; esta mutación tiene como consecuencia que los enzimas implicados en la síntesis del producto final se formen incontroladamente. 3. Mutaciones en los centros catalíticos de los enzimas que activan y transforman a los metabolitos; si se incrementa la capacidad de elección puede perderse la capacidad de un enzima de fijar al antimetabolito en lugar del metabolito; el antimetabolito pierde entonces su acción bacteriostática. 4. Una mutación en un defecto en el transporte determina que el antimetabolito no penetre en el interior de la célula y por tanto no actúe en el metabolismo. 5. Una mutación que determine la degradación constitutiva del antimetabolito; el antimetabolito es degradado por la célula y se convierte en inocuo. Únicamente los dos primeros tipos de mutantes son interesantes desde el punto de vista de la selección de mutantes con regulación defectuosa. La síntesis desreprimida de enzimas anabólicos y la pérdida de la inhibición alostérica determinan fre-

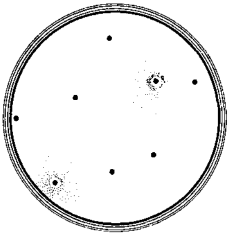


Fig. 16.15 Mutantes resistentes frente a un antimetabolito. Visión de una placa de Petri que contiene agar nutritivo con el antimetabolito, y cuya superficie se ha inoculado con 109 bacterias aproximadamente. Al principio únicamente crecen las colonias de mutantes resistentes. Los halos de colonias secundarias alrededor de dos de estas colonias grandes indican que estas últimas excretan un metabolito.

cuentemente una sobreproducción y secreción del producto final de una vía biosintética, esto es, de metabolitos. La sobreproducción del metabolito tiene como consecuencia para la célula mutada que el antimetabolito no actúe sobre los puntos de reacción en la célula y por tanto puede haber crecimiento y formación de colonias. Sin embargo, el metabolito producido en exceso es excretado y difunde en el agar formando un halo e impidiendo la acción del antimetabolito sobre las células silvestres próximas. Éstas crecen y forman pequeñas colonias. Las células de la colonia central pueden reconocerse como mutantes excretoras en este halo de colonias secundarias, que también reciben el nombre de colonias satélites (Fig. 16.15). El crecimiento de estas colonias satélites indica por tanto un defecto en la regulación. El tipo de defecto y la acumulación y excreción a él debidos requiere un análisis especial.

Mediante este método del antimetabolito se ha aislado ya una gran cantidad de mutantes con regulación defectuosa. La comparación de distintos mutantes con defecto en la regulación indica que la eliminación de la represión tiene poca importancia en la velocidad de síntesis del producto final en comparación con la modificación de la inhibición alostérica. En los mutantes en los que se ha perdido el mecanismo de inhibición en una vía biosintética tiene lugar una acumulación del producto final en la célula y frecuentemente su excreción, aunque la represión sea totalmente normal. Por el contrario, en mutantes con una considerable desrepresión (constitutividad) tiene lugar una baja acumulación del producto final y una pequeña excreción, siempre que se mantenga la inhibición por producto final. Por ello, la represión es en primer lugar importante para la economía de la síntesis de RNA y de proteínas, mientras que la síntesis del metabolito está regulada por la inhibición por producto final.

Mutantes con sensibilidad modificada frente al efector. También se han aislado según otro principio mutantes con una sensibilidad modificada en el enzima alostérico con respecto a sus efectores: como revertientes de auxótrofos ("método auxotrófico"). El procedimiento puede formularse como una receta: aíslense mutantes defectuosos que sean auxótrofos para el metabolito que se quiere que sea excretado. Escójase entre estos mutantes auxótrofos a aquellos cuya incapacidad para la biosíntesis del metabolito se deba a un defecto en el enzima alostérico de esta vía biosintética. Obténganse y aíslense a partir de estos mutantes auxótrofos defectuosos los revertientes prototróficos que ya no requieran este producto final para poder crecer y que por tanto pueden sintetizarlos ellos mismos; escójase de entre estos a los revertientes excretores. Estos últimos se pueden reconocer por bioautografía (pág. 372) o por el crecimiento de satélites. Cabe suponer que en el curso de esta doble selección el centro alostérico del enzima es inactivo en la primera mutación. La segunda mutación afectaría a la estructura (conformación) del conjunto de la molécula proteica de modo que se restablece la actividad catalítica, pero se ha perdido la sensibilidad alostérica. En éste, y en otros muchos casos, se requieren más pasos de mutación y selección para poder obtener el mutante deseado.

Aspectos teóricos y aplicados. La estrategia de la selección de mutantes es de gran importancia para conseguir aclarar el metabolismo celular y para establecer los mecanismos de regulación. No obstante, también tienen importancia en los aspectos aplicados, ya que indica el camino que hay que seguir para seleccionar conscientemente mutantes superproductores para la obtención de cualquier tipo de sustancia que pueda obtenerse con la ayuda de microorganismos.

17. Microorganismos y medio ambiente

En los capítulos anteriores se han ordenado y presentado a los microorganismos según sus propiedades fisiológicas y bioquímicas. También se han citado sus hábitats. Los conocimientos así adquiridos nos permiten ahora establecer las relaciones entre los microorganismos y su medio ambiente. A continuación trataremos en primer lugar la terminología y las **bases ecológicas**. La ecología se ocupa del comportamiento de los organismos en sus hábitats naturales, de las interrelaciones de los organismos entre sí o bien entre ellos y su ambiente.

Las **primeras señales de vida** se remontan a más de $3 \cdot 10^9$ años y desde los $0{,}5 \cdot 10^9$ años la biosfera terrestre estaba dominada por los microorganismos. Los procariotas se encuentran al inicio de la vida; a partir de ellos se han desarrollado la gran variabilidad de formas vivas eucarióticas y además han estado siempre presentes. Las formas de vida superior no han estado nunca solas en el curso de la evolución; siempre han estado limitadas o favorecidas por unicelulares ubiquistas. En las formas de vida superiores más recientes hay que ver tanto a aquellas que han prevalecido en la lucha con sus semejantes, como también a aquellas que han prevalecido en la competencia con microorganismos oportunistas. En muchos organismos se han establecido en el curso de la evolución unas relaciones simbióticas favorables, una simbiosis mutualista. El segundo apartado de este capítulo se ocupa de los microorganismos como compañeros simbióticos de otros microorganismos, de animales y de vegetales.

Los microorganismos ya estaban presentes cuando la superficie de nuestro planeta adquirió su configuración actual; ya estaban presentes cuando se desplazaron los continentes, cuando se formaron capas de más de 1000 m de grosor, cuando descendió y se alzó la superficie terrestre durante varias ocasiones y cuando se establecieron los yacimientos de metales, carbón, petróleo y gas natural. Algunas **cuestiones geomicrobiológicas** las trataremos en el tercer apartado.

Durante un lapso de tiempo que supone por lo menos un 80% del de la evolución de los organismos, la Tierra estaba habitada exclusivamente por microorganismos. A pesar de que los microfósiles son escasos, la consideración de la fisiología y la bioquímica comparada nos aportan suficientes argumentos para ordenar a los procariotas según sus tipos metabólicos. A pesar de ello, en la lectura del capítulo dedicado a la evolución de los organismos habrá que tolerar numerosas lagunas y especulaciones.

17.1 Ecología de los microorganismos

17.1.1 Introducción

Se han hecho muchos esfuerzos para conseguir aislar y describir a los microorganismos uno por uno. Las investigaciones en cultivos axénicos son esenciales para los microorganismos para poder así establecer las capacidades y funciones de cada una de las especies en la naturaleza. Las investigaciones taxonómicas, fisiológicas, bioquímicas y genéticas han hecho que durante un cierto tiempo los microbiólogos olvidasen el sentido inicial de su ciencia, esto es, el estudio del comportamiento de los microorganismos en sus hábitats naturales.

Del estudio de las interrelaciones entre los organismos, así como entre los organismos y su ambiente se ocupa la Ecología. La ecología de los microorganismos trata únicamente una porción del total del sistema ecológico. La Ecología es una ciencia muy compleja y la tratan representantes de cada una de las disciplinas biológicas bajo distintos puntos de vista. Por ello, ni siquiera los términos básicos son unitarios. Intentaremos en primer lugar establecer los términos usuales según el sentido que tienen en la ecología de los microorganismos habitualmente.

El ecosistema. La unidad básica ecológica es el ecosistema. Comprende tanto a los componentes bióticos como a los abióticos. El componente biótico es la comunidad de organismos vivos o biocenosis. Por lo general se trata de poblaciones de microorganismos, estando cada población formada por varios clones de una especie o varias especies. Entre los componentes abióticos hay que considerar las condiciones físicas y químicas del ecosistema en el que viven los organismos. Los ecosistemas de los microorganismos son muy distintos desde el punto de vista de su tamaño. Algunos ecosistemas pueden tratarse, por ejemplo, de una laguna o de la región radical de una planta. Los ecosistemas pueden ser también tan pequeños como la cavidad bucal del hombre, la panza de los rumiantes o una porción intestinal. También la totalidad del espacio habitado de nuestro planeta, la biosfera, puede considerarse como un ecosistema gigante. En relación con el ecosistema se trata también con frecuencia el concepto de **medio ambiente** ("environment"). El ambiente resulta de las relaciones entre unos organismos determinados (o una población) y sus componentes bióticos y abióticos en el ecosistema.

Hábitat. En los ecosistemas puede describirse para cada especie un hábitat concreto. El **hábitat ecológico** es el lugar o espacio vital (localidad) que habita normalmente un organismo determinado (individuo o población). A cada organismo se le puede asignar por lo menos un hábitat en el que se encuentra normalmente, donde se desarrolla y multiplica, y del que puede aislarse con la máxima probabilidad. El hábitat puede ser el sedimento de un lago, el humus de un suelo fértil, la cavidad nasal o el intestino humano. Dentro de un ecosistema determinado el microorganismo tiene por lo general un único hábitat. No obstante, un microorganismo puede tener también varios hábitats, cada uno de ellos en un ecosistema distinto. Por ejemplo, *Rhizobium* crece tanto en los suelos como en plantas; también puede pensarse que una bacteria metanogénica determinada puede tener su hábitat en el sedimento de un lago, en la panza o en los tanques de una depuradora. Con otras palabras: el hábitat indica la calle y el número de un organismo; algunos organismos pueden tener varias direcciones.

El nicho ecológico. En contraposición al hábitat, el término nicho ecológico no hace referencia a una localidad espacial, sino a una **función** de la especie o población en la comunidad. El nicho ecológico caracteriza la profesión de la especie. Puede partirse de la idea de que cada especie o población desempeña una función determinada que depende de los requerimientos nutricionales y fisiológicos, de las características genéticas, de las capacidades bioquímicas, y de las particularidades estructurales, así como de la tolerancia que presente frente a las condiciones ambientales. De la suma de estas características depende el que una especie desempeñe o no una función en un ecosistema. Téngase en cuenta que la distribución de una especie o población en realidad está más limitada que lo que cabría esperar debido a sus características. Con otras palabras: los nichos reales son por lo general más estrechos que los potenciales. Frecuentemente se debe a factores secundarios el que una especie ejerza en realidad la función que potencialmente podría desarrollar.

Un ejemplo puede aclarar este aspecto: en la panza únicamente podrán desarrollarse y cumplir su función en la degradación de la celulosa aquellas bacterias celulolíticas que sean capaces de degradarla anaeróbicamente y de obtener energía por fermentación. Además la temperatura de la panza, la presencia de ácidos grasos, enzimas, amonio, gases y otros productos tienen que poder ser tolerados. Por último, tiene que estar asegurada la eliminación continua de ciertos productos de fermentación, por ejemplo del hidrógeno. Para que se desempeñe la función en un ecosistema determinado tienen que cumplirse una serie de capacidades y permisividades.

Los habitantes del ecosistema. Según una concepción de WINOGRADSKY (1925) pueden distinguirse dos categorías entre los microorganismos que se encuentran en un ecosistema: los microorganismos autóctonos y los alóctonos. Los **autóctonos** son propios de un determinado ecosistema (suelo, intestino) y se encuentran siempre en él. En el suelo las bacterias autóctonas se encuentran siempre, independientemente de que lleguen o no al suelo determinados nutrientes externos. Su presencia se debe a la afluencia más o menos constante de nutrientes típicos del ecosistema. Entre los microorganismos **alóctonos** (o **zimógenos**) se cuentan aquellos cuya presencia se deba al incremento ocasional de la concentración de nutrientes o de un nutriente determinado. Son hasta cierto punto extraños al ecosistema y se presentan únicamente de forma transitoria o bien permanecen en formas de reposo.

Entre la flora autóctona de los ecosistemas se cuentan por lo general microorganismos altamente especializados como los nitrificantes, los habitantes de fuentes termales y otros ecosistemas extremos. Muchas bacterias ubiquistas de los suelos y las aguas pertenecen a la flora zimógena.

Número y diversidad de microorganismos en los ecosistemas. Bajo condiciones normales se desarrollan en los suelos y las aguas unas floras compuestas por un gran número de especies. En este caso "normal" significa un valor de pH neutro, una riqueza en nutrientes y un alto contenido en agua. Cuanto más se separen de las condiciones normales, esto es, cuanto más extremas sean las condiciones físicas y químicas de un ecosistema, tanto menor será la variabilidad de especies y tanto mayor el número de individuos de una especie. Esta relación entre número de especies y de individuos por una parte y lo acusado de las condiciones extremas por otra puede verse en muchos ecosistemas, por ejemplo en las fuentes termales, los lagos salados, en las aguas freáticas ácidas, en el intestino y en los suelos secos. En los ecosistemas extremos predominan aquellos organismos que están adaptados de una forma estricta a su hábitat y no pueden crecer cuando el factor extremo correspondiente es poco acusado. Éste es el caso de los microorganismos termófilos, psicrófilos, halófilos, alcalinófilos, osmófilos y otros "extremófilos".

En los ecosistemas naturales es normal la deficiencia en nutrientes. En la naturaleza libre, en los suelos y las aguas, es normal que los microorganismos estén sometidos a una deficiencia extrema en nutrientes. En los ecosistemas acuáticos la concentración de un nutriente es frecuentemente inferior a 10 µg por litro. Por ello, para la mayoría de los microorganismos la situación "normal" es de **hambre** o **pobreza**. Crecimientos extremadamente lentos o períodos alternativos de crecimiento rápido con períodos de reposo son la norma en las condiciones de vida en la naturaleza. En muchos lugares el tiempo de generación puede suponer entre 100 y 200 días. Incluso *Escherichia coli* tiene que conformarse en el recto humano con tiempos de duplicación de 20 h. En el estudio de los microorganismos no se toma en general en consideración que las capacidades potenciales de los organismos se exploran tan sólo en una dirección, esto es, bajo el punto de vista de las condiciones óptimas de crecimiento y de las elevadas tasas de crecimiento. Aún están en gran parte sin explorar las normas de reacción de los organismos bajo condiciones extremas de deficiencia.

Junto a las condiciones de deficiencia en nutrientes hay que sumar las que actualmente se designan con la palabra de moda "estrés". Se entiende por "heat stress" o "heat shock" a la reacción de las células frente a un incremento de la temperatura; p. ej. de 30 a 42°C para *E. coli*. En este caso tiene lugar una formación transitoria de gran número de proteínas nuevas, o el incremento de su síntesis, que participan en una degradación parcial del RNA y en otras reacciones. Su significado no se ha estudiado prácticamente. El **estrés por deficiencia en nutrientes** desencadena reacciones muy semejantes. Aparentemente se forman nuevos enzimas catabólicos que tienen mayor afinidad por sus sustratos que los enzimas producidos en los medios ricos en nutrientes. El desarrollo de un **estado de mayor resistencia** es la reacción más importante frente a la deficiencia en nutrientes desde el punto de vista ecológico. Las células sometidas a un estrés por deficiencia disponen de una mayor resistencia contra el shock térmico, el estrés osmótico o frente a agentes desinfectantes.

17.1.2 Ecosistemas acuáticos

La biosfera de nuestro planeta contiene una gran cantidad de ecosistemas en los cuales los microorganismos desempeñan cierto papel o donde son los únicos habitantes. Ya que no resulta posible considerar todos los ecosistemas debemos establecer aquí una limitación drástica. En esta exposición limitada debemos tomar como ejemplos los suelos en un ecosistema terrestre, y los océanos y los lagos como un sistema acuático. El considerar un suelo de cultivo fértil es enormemente interesante pero debido a la numerosa heterogeneidad en un pequeño espacio el sistema edáfico es muy complejo. Las consideraciones siguientes se concentran por ello en los sistemas acuáticos, debido en parte a que un gran porcentaje de las transformaciones microbianas tienen lugar en los medios acuáticos. Los ecosistemas acuáticos típicos son los océanos, los lagos, las lagunas, las charcas y las aguas corrientes.

Océanos. La Microbiología marina es una parte de la Biología marina y aún es muy joven. Los **productores primarios en el mar** son las algas unicelulares, el fitoplancton. La cadena alimenticia implica bacterias, protozoos, artrópodos y peces. A pesar de que los océanos sean los mayores captadores y almacenadores de energía solar aportan muy poco a la producción de nutrientes; tan sólo del 5-10% de la proteína producida sobre la Tierra procede de los océanos. La productividad está distribuida de forma muy irregular. Esta heterogeneidad entre la producción primaria y secundaria puede confirmarse con datos acerca de las cantidades de pesca: los océanos abiertos con más de un 90% de la superficie terrestre cubierta por agua, proporcionan únicamente una producción del 0,7%, la zona costera de una superficie aproximadamente del 10% producen un 54%, y las regiones naturales de afloramiento con sólo el 0,1% de superficie, proporcionan el 44% de la producción pesquera. Evidentemente la producción pesquera está estrechamente correlacionada con la producción total de biomasa. Su distribución permite reconocer claramente la limitación de la producción primaria por los nutrientes, principalmente el nitrato y el fosfato. La producción de aguas residuales ricas en nutrientes en los mares de la Tierra no tiene, por tanto, como consecuencia una contaminación; se trata más bien de una premisa para la producción de biomasa en el mar. Sin un aporte continuo de nutrientes tampoco puede obtenerse ninguna producción en los mares.

Las transformaciones bacteriológicamente interesantes tienen lugar en las **zonas litorales del mar**, en las regiones de desembocaduras (estuarios) intermareales, las marismas y las zonas de aguas salobres. La presencia constante de sulfato en el agua de mar tiene como consecuencia que en las zonas y microhábitats anaeróbicos se desarrollen bacterias reductoras de sulfatos y produzcan sulfuro de hidrógeno, cuya presencia condiciona el resto de la flora bacteriana.

Las bacterias halófilas de las zonas litorales del mar aún no han sido tan intensamente investigadas como se merecen. En la investigación debería tomarse en consideración también a las bacterias marinas, no sólo para un mayor conocimiento sino también para poder resolver algunas cuestiones de orientación práctica. Actualmente una parte de la investigación microbiológica se centra en la flora de las aguas residuales y en la degradación en las aguas de los compuestos de origen humano. Por lo tanto, las aguas residuales no contienen únicamente estas sustancias orgánicas exógenas, sino también cantidades considerables de sal, que también contienen sulfato. Presentan, por tanto, condiciones que son semejantes a las que se dan en los ecosistemas marinos. Reflexiones acerca de la biología de las aguas residuales subrayan, por tanto, la necesidad de prestar mayor atención a las transformaciones microbianas que tienen lugar en los ecosistemas marinos.

Producción primaria de biomasa en los fondos marinos. La vida de todos los organismos heterotróficos se basa en la biomasa que los vegetales ponen a su disposición a través de la fotosíntesis. La biomasa producida por las bacterias quimiolitotróficas parece porporcionalmente despreciable. Una excepción la constituye la producción primaria de biomasa en las fosas marinas afóticas. En las zonas de separación de los conti-

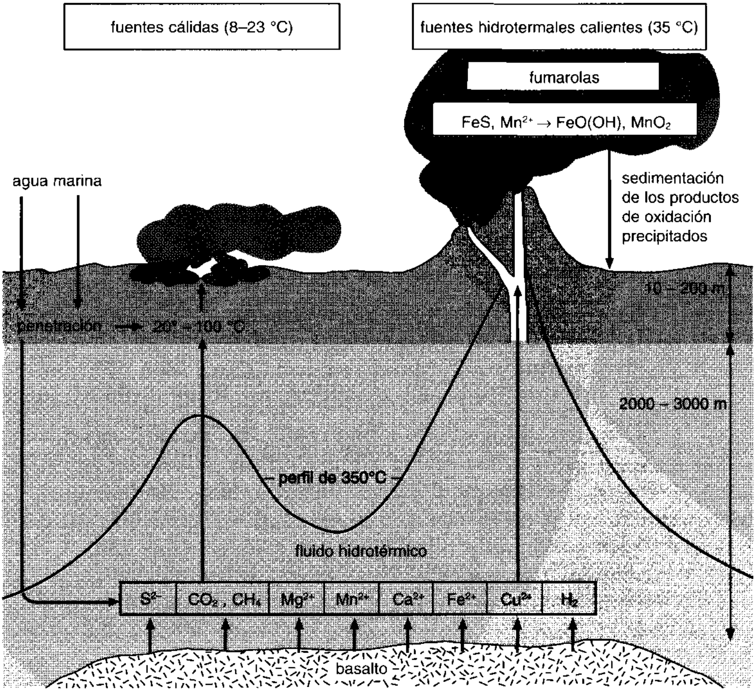

fuentes cálidas (8–23 °C)
fuentes hidrotermales calientes (35 °C)
fumarolas
FeS, Mn²⁺ → FeO(OH), MnO₂
agua marina
sedimentación de los productos de oxidación precipitados
penetración → 20° – 100 °C
10 – 200 m
2000 – 3000 m
perfil de 350°C
fluido hidrotérmico
S²⁻
CO₂, CH₄
Mg²⁺
Mn²⁺
Ca²⁺
Fe²⁺
Cu²⁺
H₂
basalto

Fig. 17.1 Representación esquemática de las fuentes hidrotermales en el fondo de los mares profundos. En las zonas tectónicas de desplazamiento de los continentes en el fondo de los mares profundos se llevan a cabo unas transformaciones geoquímicas, que tienen como consecuencia una lixiviación del magma (basalto) por el agua de mar. Las aguas hidrotermales calientes aportan gases disueltos y minerales a los fondos marinos. Las bacterias quimiolitotróficas y utilizadoras de H_2S, Fe^{2+} y H_2 representan la producción primaria que suministran con biomasa a un ecosistema muy especializado y pobre en especies. Para una explicación más completa véase texto.

nentes se forman unas fosas en las que penetra magma desde abajo y agua marina desde arriba. El agua que vuelve a salir del fondo marino contiene gases disueltos (NH_3, H_2S, H_2, CO_2, CH_4) y minerales (Ca^{2+}, Fe^{2+}, Mn^{2+}, Cu^{2+}) (Fig. 17.1). En contacto con las aguas profundas que contienen sulfatos y oxígeno, estos iones forman precipitados, que rodean formando un manto el chorro emergente. Estas rendijas de emergencia se conocen como “**fumarolas**”. Esta denominación se basa en las columnas de humo que forma el chorro de agua caliente que sale a 350°C cuando se mezcla con el agua profunda del mar. En las proximidades de estas fumarolas surgen también de las rocas basálticas fraccionadas aguas enriquecidas en gases disueltos ("fuentes termales"). Estas zonas llaman la atención por el exuberante crecimiento de moluscos, cangrejos y helmintos. Estos animales se alimentan de bacterias; entre ellas predominan las especies de oxidadoras de sulfhídrico. Crecen en suspensión o sobre superficies. Ya indicamos anteriormente (pág. 396 y sig.) la endosimbiosis entre bacterias oxidadoras del azufre y helmintos. Por tanto, en los fondos marinos afóticos existen fuentes termales y ecosistemas cuya producción primaria de biomasa no se debe a la fotosíntesis, sino a la quimiolitoautotrofía.

Lagos. La ciencia que estudia los lagos y las lagunas (Limnología) ha permitido un mejor conocimiento de los ciclos parciales y de su integración. Los lagos, las lagunas y las charcas son ecosistemas bien delimitados, acuáticos y de fácil descripción. Contienen siempre zonas aeróbicas y anaeróbicas. Estas zonas se encuentran también en la mayoría de los suelos. Mientras que en los suelos están enormemente próximas en un espacio

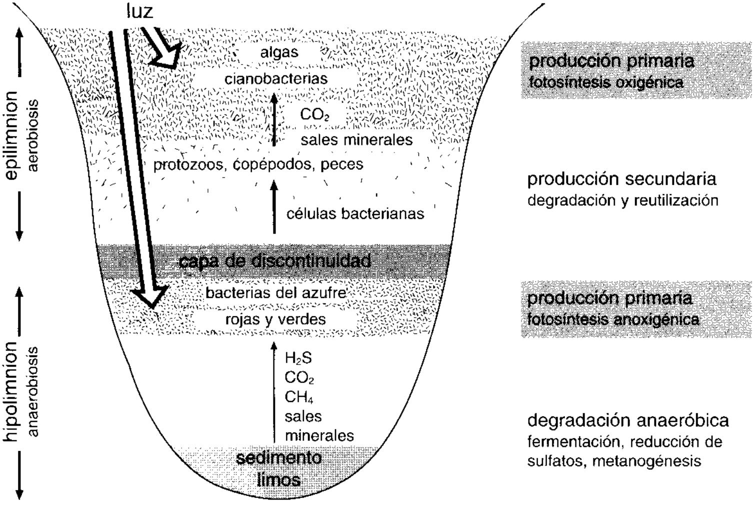

luz
epilimnion
aerobiosis
algas
cianobacterias
CO₂
sales minerales
protozoos, copépodos, peces
células bacterianas
capa de discontinuidad
bacterias del azufre
rojas y verdes
hipolimnion
anaerobiosis
H₂S
CO₂
CH₄
sales
minerales
sedimento
limos
producción primaria
fotosíntesis oxigénica
producción secundaria
degradación y reutilización
producción primaria
fotosíntesis anoxigénica
degradación anaeróbica
fermentación, reducción de
sulfatos, metanogénesis

Fig. 17.2 Diagrama de una sección vertical a través de un lago eutrófico como ejemplo de un ecosistema acuático. La capa de discontinuidad (termo o quimioclina) separa las aguas oxigenadas de las que no contienen oxígeno. En ambas se da una producción primaria fotosintética. La anaerobiosis se inicia con la degradación anaeróbica en el sedimento.

muy pequeño, y por tanto son difíciles de investigar, en las zonas correspondientes a los lagos son mucho mayores y fácilmente analizables. Puede partirse por tanto de la idea de que los resultados de la investigación limnológica pueden trasladarse en su fundamento a los suelos con su microheterogeneidad particular.

La situación física del agua tiene una gran influencia en los procesos biológicos en lagos y lagunas. La mayor densidad del agua se alcanza a los 4°C. Al aumentar la profundidad se modifica la temperatura de las aguas y puede darse una **estratificación** estacional más o menos estable (Fig. 17.2). La estratificación se presenta en dos tipos de lagos. Un tipo está representado por los lagos de agua dulce de las zonas templadas de la Tierra. En primavera se calienta por el sol el agua fría de los lagos. La superficie está más caliente; tiene una densidad menor. Se denomina **epilimnion**. Flota sobre la capa de agua más fría, el **hipolimnion**. Una zona de transición, la **termoclina** o el **metalimnion**, separa ambas capas. Las fronteras entre las dos zonas pueden ser muy precisas. En los lagos profundos la estratificación puede permanecer durante todo el verano. Debido a los procesos degradativos consumidores de oxígeno, éste desaparece en el sedimento y el hipolimnion se convierte en anaeróbico. El epilimnion está en contacto con el oxígeno y se mezcla por el viento, permaneciendo generalmente aeróbico. Por ello, la estratificación tiene como consecuencia también un gradiente de las condiciones redox y de los parámetros químicos. Por ello, a la termoclina se la denomina también **quimioclina** o capa de **discontinuidad redox**. En otoño se enfría el epilimnion. Si la temperatura del epilimnion es inferior a la del hipolimnion puede darse una mezcla de las dos capas, favorecida por las tormentas otoñales. Esta mezcla de otoño acaba con la zonación. Esta circulación total anual tiene como consecuencia que las capas profundas de agua pasen a la zona superior y se enriquezcan de nuevo con oxígeno. Además, las aguas profundas ricas en nutrientes se distribuyen de forma regular y homogénea. Los **lagos** con una circulación completa se denominan **holomícticos**. En invierno puede darse una estratificación inversa. Las aguas profundas tienen una temperatura de 4°C, y por encima se encuentra una capa de aguas más frías, que tiene una densidad menor, y posiblemente una capa de hielo. Si la temperatura del agua superficial supera en primavera los 4°C desaparece la estratificación.

Si el agua profunda rica en nutrientes llega a la superficie, tiene lugar un crecimiento masivo de cianobacterias ("floración"). El grado de transformaciones y de producción biológica depende del grado trófico (contenido en nutrientes) de las aguas; en los lagos eutróficos las transformaciones antes mencionadas son muy aparentes, en los lagos oligotróficos sólo se intuyen.

Los **lagos meromícticos** y **amícticos** se diferencian de los holomícticos. En ellos sólo se da una mezcla parcial, o no se da en absoluto, por lo que se establece un hipolimnion anaeróbico estable ("monimolimnion") y que se mantiene independientemente de la estación del año. Estas estratificaciones permanentes se dan en lagos tropicales, en los que las aguas superficiales bajan a temperaturas por debajo de las aguas profundas. Los lagos meromícticos se encuentran también en las zonas templadas. La estabilidad de la estratificación se favorece la mayoría de las veces por un elevado contenido salino de las aguas profundas (brazos de los fiordos) o por particularidades geográficas.

En el ejemplo del **lago holomíctico** podemos indicar los procesos biológicos que conducen a la estratificación estival y que perduran durante varios meses. En el epilimnion iluminado el fitoplancton (diatomeas, flagelados, algas verdes, cianobacterias) produce biomasa. Por lo general del entorno llegan al lago otras cantidades de material orgánico. Una parte de esta materia orgánica –sobre todo los componentes que contienen celulosa– se hunde hasta el fondo del lago y allí es descompuesta. Durante la degradación aeróbica inicial se consume oxígeno y el sedimento se vuelve anaeróbico. La degradación anaeróbica tiene como consecuencia la formación de productos orgánicos de fermentación y de H_2, SH_2, CH_4 y CO_2. Como no tiene lugar ninguna convección, estos productos pasan muy lentamente de los sedimentos al agua. Únicamente el metano, como principal producto final de la cadena alimentaria anaeróbica en el sedimento, se libera en forma de burbujas de gas. En su camino a través del agua hasta la superficie una parte del metano se disuelve y es oxidado por las bacterias aeróbicas consumidoras de metano. Debido a la rápida distribución del metano y al crecimiento de las bacterias oxidadoras del metano se consume rápidamente el oxígeno en el hipolimnion. Por último, todo el hipolimnion queda libre de oxígeno.

Una vez el hipolimnion se ha convertido en anaeróbico se inician los procesos microbianos anaeróbicos en el agua. Los primeros productos de fermentación son utilizados en la reducción del nitrato y el sulfato. La cantidad predominante de sulfuro de hidrógeno se produce por reducción del sulfato en el agua libre (véase Fig. 17.3). El hipolimnion y la quimioclina son El Dorado de las bacterias anaeróbicas. Cuando hay sulfuro de hidrógeno y la intensidad luminosa lo permite, crecen por debajo de la quimioclina las bacterias rojas del azufre y las bacterias verdes del azufre formando una segunda capa de producción primaria de biomasa. En esta zona se encuentran especies que disponen de vacuolas gaseosas como *Lamprocystis*, *Amoebobacter*, *Thiodictyon*, *Thiopedia*, *Pelodictyon* y *Ancalochloris*, así como especies móviles por flagelos de los géneros *Chromatium* y *Thiospirillum*. La productividad en cuanto a biomasa por la fotosíntesis anoxigénica es considerable; esto se pone de

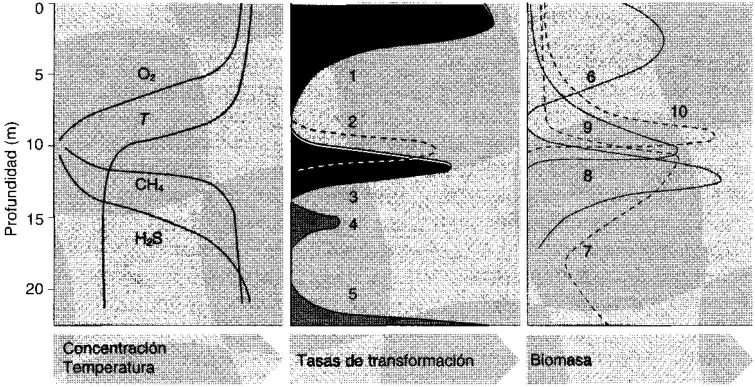


Fig. 17.3 Perfil vertical idealizado a través de unas aguas dulces de latitudes templadas, con datos de concentraciones, tasas de transformación y biomasas. La representación esquemática se basa en datos de Y.I. Sorokin (1970), V.M. Gorlenko, G.A. Dubinina y S.I. Kuzenzow (1977) así como de J. Overbeck (1972). Aclaración de los símbolos y dimensiones: T = temperatura en °C; O_2, SH_2 y CH_4 en mg/l. Tasas de transformación en µg/(l·d): (1) fijación de CO_2 en la luz (fotosíntesis oxigénica); (2) fijación de CO_2 en la oscuridad; (3) fijación de CO_2 en la luz (fotosíntesis anoxigénica); (4) y (5) reducción de sulfatos; (6) a (10) biomasas en mg/ml; (6) algas y cianobacterias; (7) masa bacteriana total; (8) bacterias fototrofas; (9) protozoos; (10) cladóceros y copépodos.

manifiesto por el número de ciliados, copépodos y cladóceros que se desarrollan en la zona inmediatamente superior de la quimioclina alimentándose allí de las bacterias fototrofas. El sulfato producido por las bacterias rojas del azufre es reducido rápidamente a sulfuro de hidrógeno, actuando seguramente productos de excreción de las bacterias fototrofas como dadores de hidrógeno para las bacterias reductoras de sulfatos.

El metalimnion se caracteriza también por una intensa actividad biológica. En él se desarrollan algunas cianobacterias, capaces de soportar el sulfuro de hidrógeno y las condiciones anaeróbicas, entre ellas *Oscillatoria limnetica.*

El perfil vertical idealizado (Fig. 17.3) y el dibujo esquemático (Fig. 17.2) confirman las relaciones antes indicadas y subrayan el hecho significativo de que **en un lago estratificado se den dos masas de agua**, en las que se da una producción primaria fotosintética: por fotosíntesis oxigénica en las capas próximas a la superficie del epilimnion y por fotosíntesis anoxigénica en las capas superiores del hipolimnion.

Aguas corrientes. En las aguas corrientes naturales, no contaminadas, el contenido en unicelulares es frecuentemente tan bajo que el agua tiene una apariencia cristalina. Debemos no obstante recordar que una suspensión de 10^6 bacterias/ml aún no se ve turbia a simple vista. Mientras la contaminación de las aguas era baja, bastaba con un recorrido de varios kilómetros a lo largo del río para que se mineralizase el material orgánico fácilmente degradable que aportaban las poblaciones. La composición de la microflora y la microfauna en las aguas corrientes es un buen indicador del grado de contaminación. Siempre que se encuentre la pulga de agua, ésta está limpia. El "hongo de las aguas residuales", *Sphaerotilus natans* indica ya una fuerte contaminación orgánica y el olor a sulfuro de hidrógeno demuestra una reducción anaeróbica de los sulfatos y debe tomarse como una señal de alarma.

Depuradoras. Una depuradora es, en su concepción, agua corriente en la que la carga orgánica es degradada aeróbica y anaeróbicamente por hongos y bacterias. Las contaminaciones de las aguas residuales pueden ser de distinto tipo, según lleven únicamente excrementos y residuos urbanos,

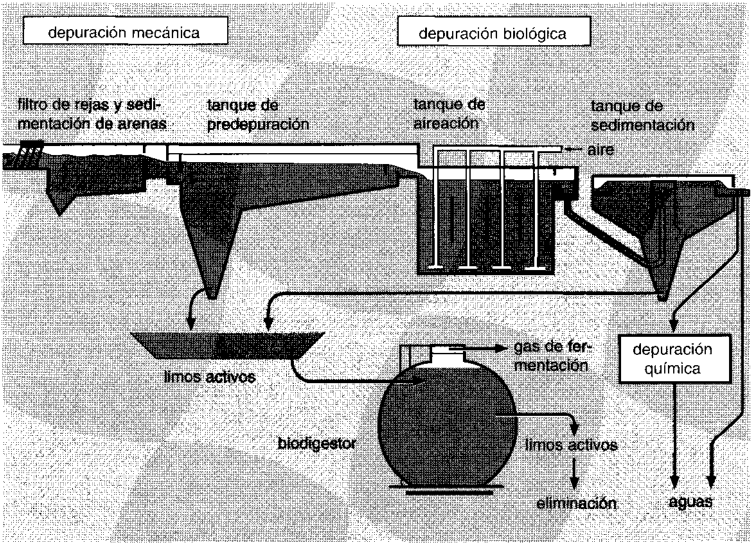

depuración mecánica
depuración biológica
filtro de rejas y sedimentación de arenas
tanque de predepuración
tanque de aireación
tanque de sedimentación
aire
limos activos
gas de fermentación
depuración química
biodigestor
limos activos
eliminación
aguas

Fig. 17.4 Esquema de una depuradora para limpiar mecánica y biológicamente aguas residuales.

o también abonos, aguas de mataderos u otros residuos industriales. La purificación de las aguas residuales tiene como objetivo liberar a estas aguas de los componentes sólidos y líquidos, minerales y orgánicos, antes de ser conducidas a los ríos. Es necesario un gran costo para mineralizar por vía microbiana la materia orgánica.

El contenido en materia orgánica degradable por vía microbiana se mide por el parámetro "**demanda biológica de oxígeno**" (DBO). Ésta es la cantidad de oxígeno necesaria para la respiración del material orgánico allí presente por los microorganismos. La DBO 5 indica, por ejemplo, la cantidad de oxígeno (en mg) que sería consumida por la microflora para respirar la materia orgánica en 5 días. La "**demanda química de oxígeno**" (DQO) indica el oxígeno necesario para la oxidación total (química) hasta CO_2 y H_2O.

Para la **depuración de las aguas residuales** en las depuradoras se han introducido distintas tecnologías. Cada una de las operaciones concuerda básicamente y comprenden: 1. la eliminación de las sustancias sólidas fácil y medianamente sedimentables en un lecho de arena y en un depósito de sedimentación; 2. la oxidación microbiana de los materiales orgánicos disueltos en una fosa con lodos activos o en un decantador; 3. la incubación de los lodos activos procedentes de las fosas anteriores bajo condiciones anaeróbicas en un biodigestor donde se formará gas (metano) y un lodo que sedimenta fácilmente (pág. 357). Este último puede transformarse fácilmente en compost y utilizarse como abono o ser quemado (Fig. 17.4). El agua purificada y clarificada puede conducirse entonces directamente o a través de conducciones hasta los ríos. Contiene aún productos de mineralización como los iones fosfato, nitrato, amonio y otros. El agua de los ríos puede quedar así tan enriquecida en nutrientes que tenga lugar una producción primaria. Para evitar una **eutrofización** de este tipo en las aguas pueden conducirse las aguas residuales a través de regadíos, utilizarse en el abonado de los bosques o bien pueden liberarse del nitrógeno combinado en una nueva depuradora con una fase de desnitrificación. Pueden purificarse además mediante un procedimiento químico, por ejemplo por precipitación de los iones fosfato mediante sales de hierro.

17.2 Microorganismos como miembros de una simbiosis

Entre los distintos microorganismos se establecen interrelaciones de distinto tipo. En el curso de la evolución se han establecido unas dependencias múltiples o unidireccionales que van mucho más allá de las relaciones determinadas por la cadena alimenticia. Después de que los procariotas y muchos microorganismos eucariotas alcanzasen su estado evolutivo actual, aparecieron las formas de vida superiores que representaban un nuevo espacio vital potencial. Los animales y las plantas se han desarrollado en un medio ambiente en el que prácticamente ya estaban presentes todos los tipos metabólicos procarióticos. Resulta por tanto comprensible que se hayan desarrollado numerosas relaciones de convivencia entre los microorganismos por una parte y los animales y las plantas por otra. La comunidad de dos organismos distintos se denomina **simbiosis**.

Desde el punto de vista del aprovechamiento relativo que extrae cada uno de los miembros de la simbiosis pueden distinguirse varias categorías: si esta comunidad vital tiene un efecto favorable o positivo para sus miembros se habla de una **simbiosis mutualista** (mutualismo). Si uno de los dos miembros sufre alguna lesión como consecuencia de esta convivencia tiene lugar el **parasitismo**. No obstante, en muchos casos los miembros pueden convivir sin una influencia mutua (neutralismo).

La convivencia puede alcanzar un diferente grado en cuanto a la unión espacial: si uno de los miembros se encuentra en el exterior de las células del otro se habla de una **ectosimbiosis**. La localización intracelular de un miembro se denomina **endosimbiosis**. Al miembro de mayores dimensiones se le denomina por lo general hospedador.

Desde el punto de vista del objetivo o del tipo de aprovechamiento que extrae uno o ambos miembros de esta comunidad pueden reconocerse distintas funciones: la asociación puede ir encaminada a la nutrición, por ejemplo por fijación de nitrógeno molecular, degradación de la celulosa y por aporte de nutrientes básicos o requerimientos nutritivos. Puede tener funciones de reconocimiento, como en el caso de la simbiosis de peces y bacterias luminiscentes. No obstante, puede tener también funciones protectoras sencillas que generalmente proporciona el hospedador al ecto y al endosimbionte microbiano, pero que también puede conducir a la protección del hospedador frente a otros microorganismos parásitos o patógenos (en el canal intestinal o sobre la piel).

Como al presentar los distintos tipos metabólicos de los microorganismos ya hemos insistido en algunas simbiosis importantes, aquí únicamente daremos una rápida visión de conjunto acerca de unas pocas comunidades importantes.

17.2.1 Simbiosis mutualistas

Entre microorganismos. Existen numerosos ejemplos del fenómeno del sintrofismo de los microorganismos, también llamado alimentación cruzada. Un buen ejemplo de asociación sintrófica es la que se estable-

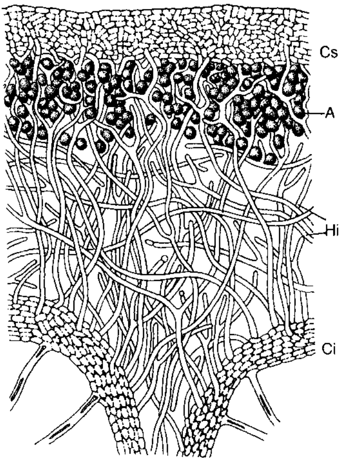


Fig. 17.5 Sección transversal a través de un talo liquénico. A = algas (ficobionte), Hi = hifas fúngicas (micobionte), Cs y Ci = capa cortical superior e inferior.

ce entre las bacterias *Desulfuromonas acetoxidans* y *Chlorobium* o también entre *Desulfovibrio* y *Chromatium*. En ambos casos la especie citada en primer lugar proporciona a la segunda el dador de hidrógeno y la segunda a la primera el aceptor de hidrógenos (pág. 350 y sig.). La sintrofía puede deberse también a la disponibilidad de vitaminas o de provitaminas. Tanto el hongo *Mucor ramannianus* como la levadura *Rhodotorula rubra*, requieren vitamina B_1 (tiamina) en el medio de cultivo para crecer con normalidad. La primera especie es capaz de sintetizar el componente pirimidínico pero no el tiazol; sin embargo, la segunda especie sintetiza el tiazol pero no piridina. Si ambos organismos crecen en un cultivo mixto la primera especie proporciona el componente pirimidínico y la segunda especie el componente tiazólico como productos de excreción de forma que cada especie satisface el requerimiento vitamínico de la otra.

Los **líquenes** ofrecen un ejemplo enormemente evolucionado de ectosimbiosis entre microorganismos. En un liquen se encuentran un hongo y un alga tan íntimamente asociados que forman un único cuerpo vegetativo unitario (Fig. 17.5). Los dos componentes resultan beneficiados en esta comunidad. Por lo general el componente fúngico del liquen, el **micobionte** es el que da la forma. El hongo recibe de las células del alga los nutrientes orgánicos, los productos de fijación del CO_2; él provee al alga de minerales y la protege de influencias desfavorables, sobre todo de la desecación. En los líquenes pueden presentarse como **ficobiontes** algas verdes y cianobacterias. Es posible separar a ambos componentes y cultivarlos aisladamente, así como formar líquenes artificiales. Los líquenes colonizan ecosistemas extremos en los que ninguno de los dos miembros podría existir aisladamente.

Si tan sólo resulta beneficiado uno de los miembros de la comunidad, sin que el otro sufra lesiones, se habla de **comensalismo**. En una preparación del queso del Harz participan un hongo y una bacteria. De esta asociación únicamente la bacteria extrae un beneficio; el hongo oxida el ácido presente en la cuajada y prepara el hábitat para que pueda ser empleado por la bacteria. Otro ejemplo de este tipo es el de la asociación de aeróbicos y anaeróbicos en los que el aeróbico determina una reducción rápida del oxígeno en el hábitat, que queda así libre de oxígeno y puede ser habitable por los anaeróbicos. Otros ejemplos hacen referencia a la excreción de "despolimerasas" por microorganismos que hidrolizan polisacáridos, proteínas o ácidos nucleicos, no para ellos mismos, sino para la alimentación de otros microorganismos.

Microorganismos y vegetales. En la región radical de muchas plantas, la **rizosfera**, se encuentran frecuentemente más bacterias que en el suelo libre. El que se propicie el crecimiento de bacterias se debe aparentemente a la excreción de nutrientes orgánicos a partir de las raíces. El beneficio de esta asociación relativamente laxa para el vegetal es difícilmente reconocible. No obstante, dado que muchas bacterias del suelo desempeñan funciones favorables para los vegetales, por ejemplo fijación de nitrógeno o descomposición de sales nutritivas difícilmente solubles, es posible que exista esta asociación mutualista. En los últimos años se han reconocido varias bacterias que aparecen regularmente como acompañantes de gramíneas y que son fijadoras de nitrógeno: *Azotobacter paspali* en la rizosfera del *Paspalum notatum*; *Azospirillum lipoferum* en la rizosfera de *Digitaria* y del maíz.

En muchos vegetales se establece una estrecha relación entre las raíces y algunos hongos, las **micorrizas**. Un gran número de hongos del suelo, entre ellos hongos de sombrerillo, están en disposición de penetrar en las raíces del vegetal, de fomentar el crecimiento radical por producción de auxinas y de introducirse en las células. Los buscadores de setas saben que algunos hongos comestibles únicamente se encuentran en las proximidades de determinadas especies arbóreas (abetos, alerce, pinos, encinas) que actúan como planta hospedadora para la micorriza. Los hongos que han penetrado en las células corticales forman unas ramificaciones vesiculares o arbustivas. El beneficio de esta asociación radica en el hongo en tener acceso a los productos de asimilación del vegetal, y en la planta en una absorción de nutrientes minerales enormemente efectiva (fosfato, nitrógeno combinado) a partir del suelo.

Acerca de las asociaciones entre plantas y bacterias fijadoras de nitrógeno endo- o ectosimbióticas ya hemos insistido anteriormente (véase pág. 441). La asociación de los rizobios con las plantas leguminosas en los **nódulos radicales** pertenece a una de las interrelaciones simbióticas más diferenciadas. La simbiosis de los nódulos proporciona un claro ejemplo del proceso de formación de una endosimbiosis y es una de las bases esenciales para el establecimiento de la hipótesis endosimbiótica (véase pág. 21).

Microorganismos y animales. Entre los microorganismos y los animales se dan un número prácticamente indefinido de relaciones simbióticas. Tan sólo en unos pocos casos se conoce la función de los miembros tan claramente como en la **simbiosis en la panza** de los rumiantes (véase pág. 458). La investigación de la simbiosis, sobre todo entre los animales inferiores, incluyendo los protozoos, ofrece numerosos problemas difíciles de resolver. Fundamentalmente se trata de la cuestión de si el tracto intestinal está colonizado por una fauna o flora de microorganismos específica, que desarrolle funciones protectoras contra microorganismos patógenos o que desempeñe funciones digestivas específicas. Del gran número de ejemplos existente únicamente podremos dar aquí una pequeña selección. Ya hemos discutido la simbiosis entre los helmintos gigantes (**pogonóforos**) y las bacterias (pág. 396, 588). En los trofosomas de *Riftia pachyptila* crecen bacterias oxidadoras del sulfhídrico como endosimbiontes. Las células sanguíneas del hospedador les suministran H_2S y O_2, y para el helminto son la única fuente de alimento. Recientemente se han descubierto pequeños pogonóforos que contienen bacterias metanogénicas como endosimbiontes.

Los **protozoos**, tanto los de vida libre como los que se encuentran en los tractos intestinales de los rumiantes, las termitas y las cucarachas, son del tipo de los ciliados, flagelados y amebas, y frecuentemente están unidos a ectosimbiontes o endosimbiontes bacterianos.

Un fenómeno ampliamente conocido desde los primeros tiempos de la investigación en genética microbiana es el gen "killer" de *Paramecium aurelia*. Tal como encontró por primera vez SONNEBORN, entre las cepas de este ciliado podían diferenciarse dos grupos: las cepas de un grupo eliminan una sustancia tóxica contra la que ellos mismos son resistentes ("killer", matadores o asesinos) mientras que las del otro grupo son sensibles y mueren por la acción de esta sustancia. La capacidad de formar esta sustancia tóxica y de matar a otras células se demostró que era un carácter determinado citoplasmáticamente y no por los genes del núcleo celular. La característica "killer" se transfiere probablemente por conjugación, de forma que el receptor sensible se convierte en un "killer". La característica "killer" se vió que iba ligada a unas partículas denominadas kappa; por último se determinó que estas últimas eran bacterias endosimbióticas. Las cepas "killer" podían "curarse" de las partículas kappa, por ejemplo por tratamiento con antibióticos. Debido a la presencia de un cuerpo de inclusión intensamente refringente, denominado cuerpo R (R-body) las partículas kappa son fácilmente reconocibles al microscopio; el cuerpo R está formado por una cinta proteica arrollada. Con él va asociada probablemente la sustancia tóxica ("killer"). Al encontrarse cabezas de fagos en las células kappa se complicó aún más el sistema; las células kappa albergan aparentemente fagos atenuados. Desgraciadamente estas bacterias endosimbióticas no han podido cultivarse aún fuera de su hospedador. La investigación acerca de estas partículas kappa ha entrado actualmente en una nueva fase debido a que recientemente se han aislado bacterias del suelo que contienen cuerpos R.

Muchos **protozoos** albergan bacterias metanogénicas, cianobacterias o algas unicelulares. Entre los ciliados que habitan la panza y los sedimentos acuáticos y marinos existen algunos que albergan como endosimbiontes a **bacterias metanogénicas**. Estos simbiontes se reconocen fácilmente al microscopio de fluorescencia por la fluorescencia de los coenzimas (F_{420} y metilpterina). Esta simbiosis es comprensible, ya que algunos protozoos en el curso de la fermentación producen H_2, que puede ser transformado a metano por bacterias metanogénicas. *Endiplodinium* se cuenta entre los protozoos de la panza. Entre los protozoos sapropélicos se cuentan la ameba gigante *Pelomyxa palustris* y varias amebas pequeñas, así como ciliados del tipo de *Metopus contortus*. Los protozoos sapropélicos que contienen organismos fototróficos se reconocen fácilmente por los pigmentos. Las algas verdes, pardas y amarillas se denominan zooclorelas y zooxantelas. El flagelado *Cyanophora* alberga a cianobacterias simbióticas, las llamadas cianelas.

Muchos **insectos** albergan a ciliados, levaduras y bacterias como simbiontes, tanto en el tracto intestinal como en los divertículos intestinales especiales. Los microorganismos se encuentran como ectosimbiontes o como endosimbiontes en células de tejidos especiales. No es difícil de imaginar la función que deben desempeñar estos microorganismos simbióticos en aquellos insectos que se alimentan de sustancias difícilmente degradables (madera, celulosa) tal como sucede en el caso de las termitas xilófagas o de aquellos que se alimentan de unas sustancias no equilibradas (jugos vegetales) como en el caso de muchos áfidos y heterópteros. Los simbiontes tienen o bien una función digestiva o proporcionan los nutrientes complementarios (esteroides, vitaminas, aminoácidos). A pesar de que las investigaciones morfológico-anatómicas de las simbiosis de los insectos han avanzado ampliamente –sobre todo a través del círculo de trabajo de P. BUCHNER– la aclaración fisiológico-bioquímica ha fracasado hasta ahora, sobre todo debido a que no se pueden cultivar los organismos simbióticos fuera del hospedador.

En muchos insectos los órganos que contienen a los endosimbiontes (micetoma) proceden de divertículos y prolongaciones del intestino posterior. Por el contrario, en la panza de los rumiantes se trata de un órgano del intestino anterior. Debemos indicar de paso que los apéndices del intestino posterior están también muy distribuidos entre los mamíferos. En muchos mamíferos que se alimentan de vegetales la preparación de los alimentos se ve favorecida por los microorganismos y se desarrolla en vesículas del intestino terminal. Como la localización de los simbiontes en el extremo final del intestino en los animales no permite un aprovechamiento total de la simbiosis, resulta comprensible que algunos de ellos coman sus propios excrementos (coprofagia) para poder asimilar las sustancias nutritivas y complementarias.

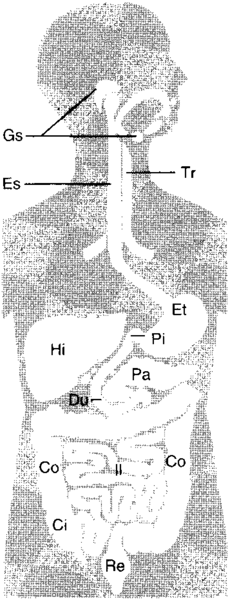
En la pagina 313 se trató ya la composición de la **flora intestinal** humana. La relación mutualista entre el hombre y su flora bacteriana se pone de manifiesto cuando se influye sobre esta relación al matar poblaciones bacterianas mediante antibióticos y quimioterápicos. Esta función de la flora intestinal se pone claramente de manifiesto en animales que se hayan desarrollado en condiciones de esterilidad. A pesar de que los animales estériles (gnotobióticos) se desarrollan de una forma ampliamente normal cuando la alimentación es apropiada, su sensibilidad frente a enfermedades infecciosas es drásticamente superior a la de los animales criados en condiciones no estériles. La flora bacteriana normal proporciona, por tanto, una función protectora decisiva frente a microorganismos patógenos u oportunistas.

Entre el hombre y la **flora de la piel** se establecen relaciones semejantes. La piel humana alberga una flora bacteriana característica, que comprende principalmente micobacterias, estreptococos, estafilococos y propionibacterias, que se alimenta de los nutrientes contenidos en el sudor. Independientemente de la producción de sustancias aromáticas la flora normal de la piel no tiene ninguna consecuencia desfavorable para el hombre. Las funciones favorables de la flora de la piel se ponen claramente de manifiesto cuando se aplican o se ingieren sustancias antibióticas o bacteriostáticas ya que afectan a las bacterias de la piel. Se reproducen entonces levaduras patógenas (*Candida albicans*) y otros hongos también patógenos.

Muchos peces marinos contienen **órganos luminosos**. Éstos son órganos morfológicamente muy bien diferenciados en los que crecen las bacterias luminiscentes (*Vibrio fischeri*; pág. 321 y sig.).

La flora bacteriana en el tracto gastrointestinal humano

El tracto gastrointestinal humano se compone de esófago, estómago, duodeno, intestino delgado (yeyuno e íleon), intestino grueso (colon) y recto. En la parte superior se encuentran pocas bacterias, alóctonas y bucales, que llegan al estómago con el quimo. Debido al bajo valor de pH del estómago (0,5-2,0) la mayoría de las bacterias, entre ellas bacterias patógenas, no sobreviven el paso por el estómago, y más allá del píloro no es extraño encontrar únicamente



órgano	funciones fisiológicas	bacterias presentes
estómago	secreción de ácidos digestión de macromoléculas (hidratos de carbono)	bacterias lácticas y organismos alóctonos
duodeno	digestión de macromoléculas (proteínas, grasas) absorción de azúcares, aminoácidos,	bacterias lácticas (*Streptococcus*, *Lactobacillus*, *Enterococcus*)
intestino delgado	ácidos grasos, sales y agua	*Bacteroides* *Eubacterium* *Peptostreptococcus* *Enterococcus* *Lactobacillus*
intestino grueso	retroabsorción de sales biliares	*Fusobacterium* *Clostridium* *Escherichia coli*

Tracto gastrointestinal humano y su flora bacteriana
Ci, ciego (con apéndice); Co, colon (intestino grueso); Du, duodeno; Es, esófago; Et, estómago; Gs, glándulas salivales; Hi, hígado; Il, íleon (intestino delgado); Pa, páncreas; Pi, píloro; Re, recto; Tr, tráquea.

10 bacterias/ml, siempre que el quimo no se haya diluido considerablemente por el consumo de bebidas. En el duodeno aparecen bacterias lácticas. Empezando por el intestino delgado superior (yeyuno) va subiendo el pH, el quimo se hace alcalino y se va modificando la flora. Bacterias anaeróbicas facultativas (coliformes) aseguran el consumo del oxígeno todavía presente y predominan las bacterias anaeróbicas estrictas, como *Bacteroides*, *Eubacterium*, *Peptostreptococcus* y *Bifidobacterium*. En el quimo se encuentran entre 10^6 y 10^7 bacterias/ml; las paredes del intestino delgado, con una longitud de 3 m, tienen una superficie interna de unos 100 m^2, y están cubiertas por un tapiz de bacterias. Al llegar al intestino grueso alcanzan las bacterias una densidad considerablemente alta (hasta 10^{11} células/g); consecuencia de ello es que del 20 al 30% de los excrementos sean bacterias, predominando *Bacteroides, Eubacterium* y *Bifidobacterium*. En el intestino grueso también se encuentran siempre bacterias lácticas, coliformes, clostridios y levaduras. *Escherichia coli* no supone más del 1% de la masa bacteriana total.

La composición de la comida y la absorción por los epitelios de las diferentes zonas intestinales tienen una influencia decisiva en las **transformaciones microbianas en el intestino**. El agua y las sales se absorben ya en el intestino delgado superior, entre ellos también Na^+, K^+, SO_4^{2-} y NO_3^-. Al intestino grueso sólo llegan 200-500 ml de agua por día. Igualmente los mono- y disacáridos se absorben en el estómago y el intestino delgado superior. No se absorben los **α-galactósidos**; el hombre no dispone tampoco de las *α-galactosidasas* correspondientes. Cuando azúcares o α-galactósidos ingeridos en exceso llegan con el quimo al intestino delgado inferior y al intestino grueso, son hidrolizados y fermentados por bacterias fermentativas, con lo que se producen **gases** (H_2, CO_2 y ocasionalmente CH_4). Las ventosidades provocadas por la ingesta de judías y otras legumbres se deben probablemente al contenido en α-galactósidos, entre los que la rafinosa, la estaquiosa y la verbascosa pueden suponer hasta el 5-15% (peso/peso).

α–D–Gal–1,6–α–D–Glu–1,2–β–D–Fru
rafinosa
α–D–Gal–1,6–α–D–Gal–1,6–α–D–Glu–1,2–β–D–Fru
estaquiosa
α–D–Gal–1,6–α–D–Gal–1,6–α–D–Gal–1,6–α–D–Glu–1,2–β–D–Fru
verbascosa

El que algunas personas produzcan grandes cantidades de gases, incluso sin consumir α-galactósidos, se atribuye a una capacidad menor para digerir algunos polisacáridos y absorber los azúcares. Una menor capacidad para absorber **lactosa** está determinada genéticamente y está muy expandida en individuos que no son de raza blanca; en estas personas llega la lactosa consumida hasta el tramo intestinal final y se da una formación microbiana de gases. El metano sólo lo forman una tercera parte de los seres humanos investigados en este sentido.

En el intestino humano normal se transforman muchos metabolitos no absorbidos, pero no a compuestos marcadamente tóxicos. El **nitrato** tampoco supone un peligro manifiesto, porque ya es absorbido por la sangre en el estómago y en el intestino superior y se elimina por los riñones, antes de que llegue a la parte inferior del intestino. No obstante, si el nitrato no es absorbido, puede darse una reducción microbiana a nitrito en el intestino delgado inferior o en el intestino grueso, y conducir a la formación de nitrosaminas, conocidas como agentes mutagénicos y cancerígenos.

La investigación de la absorción de los componentes del quimo en las diversas zonas del intestino todavía está en sus inicios. Los mejor investigados son los sistemas intestinales de los rumiantes y de las termitas. Teniendo en cuenta el enorme papel que tienen los invertebrados en la degradación de la materia orgánica en el suelo, la investigación de las transformaciones microbianas en los tractos intestinales merecen una mayor atención.

17.2.2 Simbiosis antagónicas

Las relaciones simbióticas en las que el hospedador sufre unos daños más o menos acusados tienen lugar también entre los microorganismos entre sí, y también entre microorganismos por una parte y animales o plantas por otra. Acerca de las distintas formas de parasitismo se insistió ya, por ejemplo al tratar el parásito bacteriano *Bdellovibrio bacteriovorus* (véase pág. 118); las rickettsias y clamídeas parásitas celulares estrictas (véase pág. 130 y sig.); los causantes de enfermedades vegetales (*Erwinia*, *Corynebacterium*, *Pseudomonas*, *Uredo*, *Ustilago*, *Puccinia*, *Claviceps*) y los causantes de enfermedades en animales. La Microbiología veterinaria y humana, así como la Patología vegetal se ocupan de los problemas teóricos del parasitismo y de la influencia en las relaciones de equilibrio entre los microorganismos parásitos y sus hospedadores.

Tab. 17.1 Agentes bacterianos causantes de enfermedades infecciosas y productores de toxinas.

Agente	Enfermedad	Toxina, lugar	Página
Bordetella pertussis	tos ferina	epitelio bronquial	
Borrelia burgdorferi	borreliosis	tejidos	(122)
Chlamydia trachomatis	tracoma, enfermedad ocular enfermedad venérea		(131)
Chlamydia psittaci	enfermedad de papagayos		(131)
Clostridium botulinum	botulismo	neurotoxina	(110, 231, 332)
Clostridium histolyticum	gangrena gaseosa	proteinasas, tejidos	(332)
Clostridium perfringens	gangrena gaseosa, intoxicación alimentaria	toxina, tejido conjuntivo	
Clostridium tetani	tétanos	neurotoxina	(332)
Corynebacterium diphtheriae	difteria	toxina diftérica	(102)
Escherichia coli	gastroenteritis	enterotoxina	(314 y sig.)
Helicobacter pylori	gastroenteritis, inflamación estomacal	acidificación	
Legionella pneumophila	enfermedad del legionario		
Listeria monocytogenes	listeriosis, infección generalizada	toxinas, macrófagos	
Mycobacterium leprae	lepra	piel y otros tejidos	(104)
Mycobacterium tuberculosis	tuberculosis	pulmón y otros tejidos	(104)
Neisseria gonorrhoeae	gonorrea	epitelios de la uretra	(99)
Neisseria meningitidis	meningitis	SNC	(100)
Pseudomonas aeruginosa	enfermedades de la piel y pulmonares	toxina necrótica exotoxina A	(111)
Rickettsia prowazekii	tifus	capilares sanguíneos	(130)
Salmonella enteritidis	gastroenteritis	LPS	
Salmonella paratyphi	fiebres paratíficas	LPS	
Salmonella typhi	tifus	LPS	(315)
Salmonella typhimurium	gastroenteritis	endotoxina	(315)
Shigella dysenteriae	shigelosis, diarrea	neurotoxina, LPS	(315)
Staphylococcus aureus	piógeno, intoxicación alimentaria	toxina (enterotoxina)	(99, 231)
Streptococcus pneumoniae	neumonía	hemolisina	(304)
Streptococcus pyogenes	piógeno, escarlatina	estreptolisinas	(304)
Treponema pallidum	sífilis	tejidos	(121)
Vibrio cholerae	cólera	enterotoxina	(315)
Yersina pestis	peste, peste bubónica, peste neumónica	pesticina	(315)

Bacterias patógenas. En la tabla 17.1 se resumen las bacterias patógenas humanas más importantes, la mayoría de las cuales se han presentado ya abreviadamente, a pesar de que este texto excluye los aspectos de medicina humana, veterinaria y fitopatológicos, así como la inmunología.

17.3 Microorganismos y desarrollo terrestre

Los microorganismos han participado decisivamente en la formación de la corteza terrestre. El que se hayan separado parcialmente los elementos y compuestos que se encontraban mezclados en las rocas primigenias se puede atribuir en gran medida a los microorganismos. Los yacimientos de muchas materias primas que se explotan actualmente se deben total o parcialmente a la actividad microbiana.

Depósitos de hierro. Los mayores yacimientos de hierro son las rocas férricas bandeadas, denominadas "banded iron formations", abreviadamente BIF. La deposición de estos óxidos de hierro tuvo lugar principalmente hace 2800 a 1600 millones de años. Hasta entonces el hierro liberado de las rocas magmáticas de los fondos marinos en forma de hierro ferroso se había acumulado en grandes cantidades en los mares, conjuntamente con otros iones reducidos (S^{2-}, Mn^{2+}). Al iniciarse la fotosíntesis oxigénica por las cianobacterias se oxidó el S^{2-} a SO_4^{2-} y el Fe^{2+} a Fe^{3+}. Estos últimos son difícilmente solubles. Se produjeron precipitaciones de óxidos de hierro en grandes superficies allí donde las aguas profundas que contenían hierro entraron en contacto con aguas superficiales oxigenadas. En los BIF se intercalan capas de óxidos de hierro con capas de grava (de 0,2 a 2 mm de espesor). Se considera a esta estratificación como una consecuencia de los ritmos anuales de la fotosíntesis en las cuencas de sedimentación (Fig. 1.3). Una vez consumada la oxidación del azufre y del hierro en las aguas marinas pudo empezar a enriquecerse la atmósfera en O_2 (desde hace 1600 millones de años).

Los microorganismos participan en la movilización y precipitación del hierro en las rocas graníticas. La fracción azufrada de la pirita o de la marcasita es oxidada hasta ácido sulfúrico por *Thiobacillus thiooxidans* y *T. ferrooxidans*, de forma que el hierro pasa a la forma de sal ferrosa soluble y luego es oxidada por *T. ferrooxidans* hasta la sal férrica (véase lixiviación, pág. 397). Por neutralización del agua precipita el hierro férrico en forma de $Fe(OH)_3$. Numerosos yacimientos de óxido de hierro muy puro son probablemente debidos a una lixiviación microbiana ("leaching-process") a lo largo de millones de años. En otros lugares participan con toda seguridad ácidos orgánicos (ácidos húmicos) en la solubilidad del hierro. La última oxidación del hierro ferroso a hierro férrico puede tener lugar biológicamente por las bacterias del hierro, como

Gallionella o *Siderocapsa* (a pH neutros). El resultado de las transformaciones son las menas de hierro de los pantanos.

Depósitos de carbonato cálcico. En muchas aguas el calcio se presenta en forma de $Ca(CO_3H)_2$ o de $CaSO_4$. Por modificación del pH o por eliminación de anhídrido carbónico a través de la fotosíntesis, el bicarbonato pasa a la forma difícilmente soluble, carbonato cálcico y precipita. Bajo condiciones anaeróbicas el sulfato cálcico precipita en forma de carbonato cálcico, cuando el sulfato es reducido por las bacterias reductoras de sulfato hasta sulfuro de hidrógeno:

$$CaSO_4 + 8\,[H] + CO_2 \longrightarrow CaCO_3 + 3\,H_2O + H_2S$$

Una gran parte de la caliza se ha producido probablemente porque el carbonato ácido de calcio es transportado en las aguas tropicales y allí tiene lugar un incremento en la temperatura con la consiguiente liberación de CO_2 y precipitación de carbonato cálcico.

$$Ca(HCO_3)_2 \leftrightharpoons CaCO_3 + H_2O + CO_2$$

Depósitos de azufre. Los depósitos de azufre explotables se deben a la reducción bacteriana de sulfatos. Cuando se descomponen los compuestos orgánicos bajo condiciones anaeróbicas en presencia de sulfatos éste actúa como aceptor primario de hidrógenos. El sulfuro de hidrógeno así formado reprime todos los otros procesos respiratorios anaeróbicos potencialmente posibles. Estudios mediante isótopos confirman la conclusión de que los yacimientos de azufre de Texas y Louisiana tienen un origen biógeno.

El azufre se encuentra en el agua marina preferentemente en forma de dos isótopos estables: un 95% en forma de ^{32}S y un 4% como ^{34}S. En la reducción bacteriana de sulfatos (principalmente limitada por los suministros de dadores de hidrógeno) el sulfato que contiene al isótopo más ligero ($^{32}SO_4^{2-}$) tiene una mayor probabilidad de ser captado por las células y de reducirse, que el sulfato ^{34}S. El sulfuro de hidrógeno así formado contiene por tanto menos ^{34}S que el sulfato del agua de mar. Cuando este sulfuro de hidrógeno "ligero" es oxidado (bien biológica o bien abióticamente) se forma azufre "ligero". El contenido en isótopos del azufre en los yacimientos anteriormente indicados demuestra que éste tiene un origen biógeno. La proporción isotópica del azufre biógeno se diferencia considerablemente del azufre de origen volcánico (Sicilia).

La discusión de las transformaciones biogeoquímicas puede continuarse considerando la formación de los yacimientos de carbono, petróleo, gas natural, sílice y bauxita. En éstas y en otras transformaciones, los microorganismos participan activamente debido a sus capacidades metabólicas, esto es, mediante oxidaciones, fermentaciones, acidificaciones, reducciones, asimilación de anhídrido carbónico y formación de productos volátiles. Estas transformaciones tienen como consecuencia la mineralización, la disolución, la movilización y la inmovilización. La Geomicrobiología es la ciencia que se ocupa del círculo de problemas procedentes de la actuación de los microorganismos en la formación, modificación y disolución de las rocas.

17.4 Evolución de los microorganismos

La estructura molecular y los procesos bioquímicos son iguales en todos los organismos. Estos conocimientos se han comprobado y ampliado constantemente y se han resumido en el principio de la "unidad bioquímica de los seres vivos" (apartado 7.1). Considerando esta uniformidad de principio, las diferencias y desviaciones aparecen como insignificantes. Puede aceptarse que todos los seres vivos actualmente existentes han sufrido una larga historia común de desarrollo; a partir de formas sencillas se han ido desarrollando paulatinamente formas de complejidad creciente. Los organismos primitivos no se han conservado. Sus nichos ecológicos han sido ocupados por organismos que derivaban de otros más desarrollados y que han adquirido características cuasi-primitivas. La evolución de los organismos es uno de los problemas centrales de la Biología. En palabras de DOBZHANSKY *"Nothing in biology makes sense unless in the light of evolution"*.

La atmósfera terrestre primitiva. La Tierra se formó pobablemente por una colisión de material interestelar, y por calentamiento y fluidificación del interior de la Tierra llegaron agua y gases a su superficie. Los expertos asumen que la atmósfera primitiva de la Tierra debía tener una composición semejante a la que tienen actualmente las envueltas gaseosas de Marte o Venus, esto es, 3% de N_2, 96% de CO_2, 0,1% de H_2O, y menos de un 1% de oxígeno. En la Tierra podría haber también O_2 como consecuencia de la fotólisis del abundante vapor de agua presente; no obstante se redujo inmediatamente por los iones ferrosos y sulfuro de hidrógeno. La atmósfera anóxica ofreció condiciones favorables para la evolución química.

La evolución química. La hipótesis de que la vida pudiera llegar a nuestro planeta desde fuera prácticamente no se discute actualmente de una forma seria. La aparición de unidades biológicas autorreproductoras tuvo que tener lugar en las primeras épocas de su desarrollo sobre la Tierra. Según la concepción representada ya por HALDANE y OPARIN, en esta época primitiva tuvieron que acumularse grandes cantidades de materiales orgánicos. Los organismos capaces de utilizar y mineralizar estas sustancias orgánicas aún no existían. No hay ninguna duda acerca de la evolución química desde las experiencias realizadas por MILLER en las que demostró experimentalmente que a partir de materia inorgánica (H_2, CO_2, CH_4, NH_3, H_2O) bajo condiciones apropiadas podían sintetizarse moléculas orgánicas sencillas. Se acepta que en una atmósfera reductora, libre de oxígeno y con acción de las radiaciones solares químicamente activas y también mediante descargas eléctricas pudieron formarse y acumularse materiales orgánicos adsorbidos en minerales arcillosos (montmorillonitas) y pirita. Estos minerales de gran superficie específica pueden haber desempeñado un gran papel en la estructuración y polimerización de los sillares. Una hipótesis muy interesante se basa en el descubrimiento de que el sulfuro ferroso en condiciones anaeróbicas estrictas con H_2S se transforma en pirita e hidrógeno

$$FeS + H_2S \longrightarrow FeS_2 + H_2; \quad \Delta G_o = -38{,}4 \text{ kJ/mol}$$

Esta reacción es exergónica. Proporciona tanto energía como superficies estructuradas con carga positiva. Cumple así con la condición necesaria para una polimerización ordenada de los sillares orgánicos. Las condiciones externas necesarias para que la evolución química diese lugar a la aparición del primer ser vivo autorreproducible, debieron ser grandes cantidades de compuestos orgánicos, así como superficies catiónicas y aniónicas estructurales.

La evolución biológica. La transición de la materia orgánica inanimada hasta la célula viva tiene que haberse dado en el curso de un lapso de tiempo relativamente corto. Existe el consenso de que la Tierra se originó hace 4500 o 4600 millones de años. Se han encontrado estromatolitos en las rocas sedimentarias más antiguas de hace 3500 millones de años. Igualmente antiguas son las rocas sedimentarias en las que se ha podido demostrar la presencia de carbono orgánico (C_{org}).

Los estromatolitos y el C_{org} se consideran como las primeras señales de vida y como indicación de que entre los primeros seres vivos predominaron los autótrofos. Los argumentos para esta suposición son los siguientes: (1) Los **estromatolitos** provenientes del arcaico son muy parecidos a las formas recientes. Por definición, los estromatolitos son rocas sedimentarias biógenas, esto es, estructuras organosedimentarias, que se han formado por unión y precipitación de minerales formadores de sedimentos en el curso del crecimiento y actividad biológica de microorganismos. Los estromatolitos actuales se forman por cianobacterias filamentosas. Su fijación autotrófica del CO_2 conduce a una alcalinización del medio en su entorno, y por tanto a una precipitación de carbonato cálcico. El resultado es una matriz caliza con perforaciones tubiformes. En cuanto a los organismos, tiene que haberse tratado de bacterias filamentosas, autotróficas, de movimiento deslizante. Como las cianobacterias cumplen con estas condiciones, se pensó que había que admitir que los estromatolitos arcaicos eran testigos de la fotosíntesis oxigénica realizada hace ya 3500 millones de años. Permanece sin discusión el que estuviesen implicadas bacterias autotróficas. No obstante, también hay bacterias autotróficas, fijadoras de anhídrido carbónico entre los fotosintéticos anoxigénicos, así como en bacterias quimiolitoautotróficas de respiración anaeróbica (formadoras de metano y sulfhídrico). Entre ellas también se dan formas filamentosas.

(2) El segundo argumento para la suposición de que el carbono orgánico que llegó a los sedimentos en el arcaico temprano provenía de bacterias autótrofas se basa en datos obtenidos de la **composición isotópica**. El carbono orgánico (C_{org}) aislable de los sedimentos es un "querógeno", tal como se denomina el producto final altamente polimerizado e insoluble en ácidos, resultado de la transformación de la materia orgánica en el sedimento. Al igual que la mayoría de los bioelementos el carbono está compuesto por una mezcla de isótopos, el ^{12}C y el ^{13}C. Todas las vías conocidas de la fijación autotrófica del CO_2 conducen a un enriquecimiento del isótopo ligero ^{12}C en el material celular sintetizado. Éste ha sido el resultado de numerosas medidas en bacterias recientes fijadoras de CO_2. Como este querógeno arcaico tiene aproximadamente la misma composición isotópica que la biomasa de bacterias autótrofas recientes, la formación del querógeno arcaico se ha de deber a bacterias autótrofas.

La evolución de los procariotas. Basándonos en los hechos anteriormente indicados, puede suponerse (de forma libre y altamente especulativa) el orden en que fueron apareciendo los tipos fisiológicos (Fig. 1.3). Durante mucho tiempo se discutió la cuestión de si las primeras bacterias tenían un metabolismo heterótrofo o autótrofo. No obstante, no hay ningún argumento en contra de aceptar una evolución simultánea de los tipos metabólicos de los fermentadores heterotróficos y de las bacterias autotróficas de respiración anaeróbica, así como del intercambio de material genético en todos los estadios de la evolución temprana. La abundante presencia de compuestos orgánicos podría haber posibilitado el desarrollo de procesos metabólicos, que conocemos de los fermentadores recientes, y que tienen en las vías metabólicas centrales un papel sobresaliente. La presencia de CO_2, azufre, sulfato, hierro férrico e hidrógeno molecular (este último como producto de la desgasificación del magma y los basaltos, así como de la formación de pirita y de la fotólisis del agua) podría haber posibilitado el desarrollo de procesos metabólicos, que conocemos de la "respiración anaeróbica" (apartado 9.2, 9.3 y 9.4). Así podría haber aparecido un transporte eficiente de electrones con el establecimiento de un potencial de protones, que posibilitase una regeneración de ATP. A este nivel podrían haberse desarrollado los porfirinoides que contienen níquel o hierro, así como la autotrofía por el carbono. La **vía reductiva del**

acetil-CoA es sin duda la primera vía de la fijación autotrófica del CO_2. Como representantes recientes de este tipo hay que ver a las bacterias metanogénicas y acetogénicas, así como a los respiradores de azufre y sulfato (productores de sulfuro). Los mecanismos hoy día bien conocidos de transferencia horizontal de información genética –por bacteriófagos, plásmidos o DNA libre– permiten suponer que mecanismos similares aseguraron en el arcaico un intercambio de información y una rápida evolución.

Una vez "descubierto" el sistema de fosforilación en la cadena de transporte de electrones, pudo utilizarse la **luz como fuente energética** en el fotosistema I. Las porfirinas con magnesio (clorofilas) actuaron como centros de reacción. Los primeros organismos fototróficos pudieron asimilar materia orgánica en la luz del mismo modo que las Rodospiriláceas. Con la adquisición de la capacidad de fijar el anhídrido carbónico a través del ciclo de la ribulosabifosfato y de emplear dadores inorgánicos de hidrógeno (H_2O, SH_2, S) se desarrolló el tipo metabólico de las bacterias rojas del azufre (Cromatiáceas). El desarrollo de un segundo fotosistema condujo a una mayor independencia con respecto a las sustancias disueltas en el agua. El fotosistema II permitió un transporte abierto de electrones, con el agua como dador de electrones. Este proceso iba ligado ineludiblemente a la liberación de oxígeno. La fotosíntesis oxigénica condujo a la aparición de una atmósfera terrestre oxidante. Los primeros organismos fotosintéticos generadores de oxígeno están representados por las cianobacterias.

Autotrofía. Actualmente conocemos **tres vías de la fijación autotrófica de anhídrido carbónico**, el ciclo de la ribulosabifosfato, el ciclo reductivo de los ácidos tricarboxílicos y la vía reductiva del acetil-CoA. La fijación del CO_2 y la transformación a metabolitos es un proceso reductivo. Como en ausencia de oxígeno no puede darse una reoxidación de los metabolitos, en condiciones anóxicas bastaba para la reducción del CO_2 con ir añadiendo una secuencia de reacciones totalmente reversibles que con poco coste energético formasen compuestos reducidos de carbono. Estos argumentos ofrecen una explicación plausible de la distribución de la **vía reductiva del acetil-CoA** entre las bacterias anaeróbicas estrictas.

En presencia de oxígeno la reducción del CO_2 requiere una serie de reacciones enzimáticas en las que se incluyan pasos irreversibles. Una serie de reacciones de este tipo la ofrece el **ciclo de Calvin**. Éste es energéticamente costoso y puede haberse desarrollado a partir de las vías centrales del metabolismo de los azúcares. Únicamente los organismos que realizan una fotosíntesis oxigénica o anoxigénica disponen de un ciclo de Calvin, así como las bacterias quimiolitoautotróficas procedentes de las bacterias rojas. No se ha encontrado en las arqueobacterias. Esto está de acuerdo con la suposición de que el ciclo de Calvin se consiguió después de la separación de las arqueobacterias y las eubacterias. La vía del acetil-CoA parece estar muy extendida entre las arqueobacterias, y dentro de las eubacterias se ha encontrado únicamente en los desulfuricantes, clostridios acetogénicos y en *Acetobacterium*.

La transición de la atmósfera reductora primitiva hasta una atmósfera con oxígeno supone sin ninguna duda la mayor transformación en la evolución de los seres vivos y de los minerales. El desarrollo de citocromos hasta endoxidasas y la utilización del oxígeno como aceptor de electrones posibilitó el tipo metabólico de las bacterias respiradoras aeróbicas.

Se acepta que hace 2100 millones de años todos los procariotas fototrofos y con respiración ya tenían que estar presentes tal como actualmente los conocemos. Según descubrimientos geológicos, hace ya 2700 millones de años tienen que haber habido unas pequeñas concentraciones de oxígeno, y desde hace 1200 millones de años toda la vida sobre la Tierra se basa en la fotosíntesis biológica y en el oxígeno producido por los vegetales. Por oxidación de metales y minerales con ayuda del oxígeno los seres vivos en desarrollo han participado también en el desarrollo y formación del mundo geológico actual.

Hasta hace 600 millones de años el contenido en oxígeno de la atmósfera se encontraba probablemente sólo al nivel del 2%. Tan sólo cuando las plantas verdes conquistaron la Tierra y le otorgaron una cubierta vegetal aumentó rápidamente la concentración de oxígeno hasta que alcanzó el 21% actual. La producción de oxígeno ha ido paralela a una deposición de carbono en forma de carbón, petróleo, gas natural y rocas sedimentarias ricas en carbono.

Los testigos fósiles del precámbrico temprano son muy escasos. Debido a su pequeño tamaño y a la ausencia de componentes duros, los fósiles de las formas primitivas de vida únicamente han podido conservarse bajo condiciones particulares. Las estructuras que han podido verse en sedimentos de Minnesota de hace 2700 millones de años permiten reconocer bacterias y cianobacterias. Los sedimentos sudafricanos en los que se han encontrado igualmente estructuras semejantes a las bacterias tienen 3100 millones de años de edad. Éstas son las trazas de vida más primitivas conocidas.

La evolución de los eucariotas. La evolución de los eucariotas parece haberse desarrollado cuando hubo oxígeno disponible. Todos los eucariotas, excepto una pocas excepciones, son aeróbicos. Los procariotas habían ocupado muchos nichos ecológicos. Su desarrollo hacia la versatilidad metabólica se basa probablemente en la estructura celular sencilla, sistemas de regulación muy sofisticados, elevadas tasas de crecimiento y varios mecanismos de transferencia genética. No obstante, había dificultades insalvables para un desarrollo posterior, sobre todo el pequeño tamaño del genoma, el estado esencialmente haploide de su genoma y el pequeño tamaño celular. Las nuevas condiciones ambientales, condiciones aeróbicas, permitieron rendimientos energéticos superiores; para su aprovechamiento harían falta células mayores, posibilidades de diferenciación estructural, y como consecuencia un genoma varias veces mayor, para poder almacenar más información. El tamaño genómico de $5 \cdot 10^9$ parece el límite superior de peso molecular de un cromosoma bacteriano de una única doble cadena. Una evolución posterior requería de otro modelo.

Las **diferencias entre una célula procariótica y eucariótica** son enormes. A continuación resumimos aquí otra vez las más importantes: 1. Separación por una membrana nuclear del almacén de información, DNA, de los espacios metabólicos. 2. Por ello, desacoplamiento de la transcripción (en el espacio nuclear) y de la traducción (en el citoplasma). 3. Distribución del genoma en varios fragmentos: varios cromosomas lineales en lugar de uno único circular. 4. Limitación de la replicación del DNA a una interfase: cada cromosoma tiene varios replicones, y los cromosomas hijos se separan unos de otros por mitosis. 5. Mecanismos de movimiento intracelulares, basados en actina y tubulinas para el movimiento de los cromosomas durante la mitosis, meiosis y cariogamia, así como de vesículas (lisosomas, peroxisomas y otros "microbodies" –microcuerpos). 6. Discontinuidad de los genes del DNA y del RNA. 7. Asociación al DNA de complejos histónicos ordenados como cuentas de un collar (estructura de nucleosoma). 8. Meiosis: apareamiento de cromosomas y reducción de la dotación diploide a haploide. Posibilidad de combinación sexual y nuevas combinaciones de genes y alternancia entre haplofase y diplofase del crecimiento vegetativo. 9. Exocitosis: los exoenzimas no se sintetizan directamente en la membrana citoplasmática y se exportan simultáneamente, sino que se forman en membranas internas (retículo endoplasmático), se transportan en cisternas y se vacían en el exterior. 10. Endocitosis como fagocitosis o pinocitosis, así como la capacidad de albergar endosimbiontes celulares. 11. Mitocondrias y cloroplastos para la regeneración de energía (ATP). 12. Cilios 9 + 2. Por tanto, el eucito (célula eucariota) se diferencia del protocito (célula procariota) por una diversidad de estructuras y funciones. Aunque se conozcan algunos eucariotas a los que les falta un carácter u otro, no existe ninguna forma primitiva que permita reconocer en qué secuencia fueron apareciendo los nuevos caracteres. Aparentemente cada paso individual aportó una ventaja selectiva muy pequeña, por lo menos en comparación con el organismo más próximo que tuviese una dotación mejor. Los eslabones intermedios no han sobrevivido y eran tan poco duraderos, que no se ha mantenido ningún eslabón intermedio en estado fósil analizable funcionalmente. Se dispone de pocos organismos recientes que podamos considerar como formas derivadas de los eslabones intermedios. La posibilidad de conseguir establecer un orden de las nuevas propiedades enumeradas anteriormente hay que considerarla bajo una perspectiva pesimista. No obstante, hay que suponer que en la evolución temprana de la célula eucariótica aparecieron diversos modelos de la organización celular, antes de que se desarrollaran los organismos pluricelulares.

Monopolios que han quedado para los procariotas. Es significativo que los eucariotas se especializasen en la fotosíntesis y en el modo de vida aeróbico, y dejasen a los procariotas muchas funciones ecológicas de significación esencial. A ellas pertenece la fijación de nitrógeno, la nitrificación, la desnitrificación, la respiración del sulfato y del azufre, la oxidación del azufre y metales, la producción y utilización de metano. El ciclo del nitrógeno y del azufre son dominados total o parcialmente por los procariotas. Los procariotas pueden hacer funcionar los ciclos de los elementos en nuestro planeta y mantener la biosfera, sin intervención de los eucariotas, mientras que los eucariotas por sí solos no estarían capacitados para ello.

Mientras que los procariotas se han desarrollado aisladamente durante miles de millones de años, los eucariotas no estuvieron nunca solos, siempre tuvieron que enfrentarse a los procariotas. Ofrecieron a los procariotas nuevos nichos ecológicos, protección y presas. Los mecanismos altamente desarrollados de defensa, protección y supervivencia de los pluricelulares pueden deberse, por lo menos parcialmente, a la agresividad de los procariotas. Por otra parte, los eucariotas aprendieron a extraer una ventaja a su favor de la estrecha asociación con los procariotas, y los tomaron como ectosimbiontes (en el tracto intestinal, en la piel, en la panza) y como endosimbiontes (para la fijación de nitrógeno, producción de biomasa por fotosíntesis o para la utilización del SH_2 y liberación de H_2).

La evolución de los organismos ofrece problemas fascinantes. Su investigación no ha hecho más que empezar.

Bibliografía

I. Textos de Microbiología

Atlas, R. M. (1984), Microbiology, Fundamentals and Applications, MacMillan, Publ. Comp., New York.

Brock, T. D., Madigan, M. T. (1973). Biología de los Microorganismos, Ediciones Omega, S.A., Barcelona.

Davis, B. D., Dulbecco, R., Eisen, H. N., Ginsberg, H. S. (1990), Microbiology, 4ª ed., J. B. Lippincott/Harper Row, London.

Neidhardt, F. C., Ingraham, J. L., Low, K. B., Magasanik, B., Schaechter, M., Umbarger, H. E. (1987), *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium:* Cellular and Molecular Biology, Am. Soc. Microbiol., Washington, D. C.

Pelczar, M. J. jr., Chan, E. C. S., Krieg, N. R. (1986), Microbiology, 5ª ed., McGraw-Hill, New York.

Stanier, R. Y., Ingraham, J. L., Wheelis, M. L., Painter, P. R. (1986). The Microbial World, 5ª. ed., Prentice-Hall, Englewood Cliffs.

Thimann, K. V. (1955), The Life of Bacteria. Their Growth, Metabolism and Relationships, MacMillan, New York.

II. La célula y su estructura

Alberts, B., Bray, D., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., Watson, J. D. (1996), Biología Molecular de la Célula, 3ª ed., Ediciones Omega, S.A., Barcelona.

Carlile, M. J. (1980). From Prokaryote to Eukaryote: Gains and Losses, Symp. Soc. Gen. Mikrobiol, *30*, 1.

Cavalier-Smith, T. (1981), The Origin and Early Evolution of the Eukaryotic Cell, Symp. Soc. Gen. Microbiol, *32*, 33.

Darnell, J., Lodish, H., Baltimore, D. (1993), Biología Celular y Molecular, 2ª ed., Ediciones Omega, S.A., Barcelona.

Gunsalus, I. C., Stanier, R. Y. (eds.) (1960), The Bacteria, Vol. I, Academic Press, New York.

Mayer, F. (1988), Methods in Microbiology, Vol. 20, Academic Press, London.

III. Los grupos de procariotas

Buchaman, R. E., Gibbon, N. E. (eds.) (1974), Bergey's Manual of Determinative Bacteriology, 8ª ed., Williams & Wilkins, Baltimore.

Krieg, N. R., Holt, J. G. (1984-1989), Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, Vol. 1-4, Williams & Wilkins, Baltimore.

Lapage, S. P., Sneath, P. A. M., Lessel jr., E. F., Skerman, V. B. D., Seeliger, H. P. R., Clark, W. A. (1975), International Code of Nomenclature of Bacteria, Am. Soc. Microbiol. Washington, D. C.

Schleifer, K. H., Stackebrandt, E. (1983), Molecular Systematics of Prokaryotes, Annu. Rev. Microbiol, *37*, 143.

Skerman, V. B. D. (1967), A Guide to the Identification of the Genera of Bacteria, 2ª ed., Williams & Wilkins, Baltimore.

Starr, A., M. P. Stolp, H., Trüper, H. G., Balows, Schlegel, H. G. (eds.) (1981), The Prokaryotes. A Handbook on Habitats, Isolation and Identification of Bacteria, Vol. I y II, Springer-Verlag, Berlín, Heidelberg, New York.

IV. Los virus: propagación y estructura

Davis, B. D., Dulbecco, R., Eisen, H. N., Ginsberg, H. S. (1990), Microbiology, 4ª ed., J. B. Lippincott/Harper & Row, London.

Fraenkel-Conrat, H., Kimball, P. C., Levy, J. A. (1988), Virology, 2ª ed., Prentice Hall, Englewood Cliffs.

Glass, R. E. (1982), Gene Function, *E. coli* and its Heritable Elements, Croom Helm, London.

Hershey, A. D. (ed.) (1971), The Bacteriophage Lambda, Cold Spring Harbor Monograph Series, Cold Spring Harbor, New York.

Luria, S. E., Darnell, J. E. (1974), Virología general, Ediciones Omega. S.A., Barcelona.

Watson, J. D., Hopkins, N. H., Roberts, J. W., Steitz, J. A., Weiner, A. M. (1987), Molecular Biology of the Gene, 4ª ed., The Benjamin/Cummings Publ. Comp., Inc., Menlo Park, California.

V. Los hongos (Fungi = Mycota)

Esser, K. (1982), Cryptogams, Cyanobacteria, Algae, Fungi, Lichens, Cambridge University Press, London.

Smith, J. E., Berry, D. R. (1978), The Filamentous Fungi. (Industrial Mycology. Biosynthesis and Metabolism. Developmental Mycology.) Vols. I-III. E. Arnold, London.

Webster, J. (1980), Introduction to Fungi, 2ª ed., Cambridge University Press, London.

VI. El crecimiento de los microorganismos

Gunsalus, I. C., Stanier, R. Y. (eds.) (1962), The Bacteria, vol. IV, Academic Press, New York, London.

Ingraham, J. L., Maaløe, O., Neidhardt, F. C. (1983), Growth of the Bacterial Cell, Sinauer Ass. Inc., Sunderland, Mass.

Malek, I., Fencl, Z. (1966), Theoretical and methodological Basis of Continuous Culture of Microorganisms, Academic Press, New York, London.

Mandelstam, J., McQuillen, K., Dawes, J. (eds.) (1982), Biochemistry of Bacterial Growth, 3ª ed., Blackwell Sci. Publ., Oxford.

Schlegel, H. G., Kröger, E. (eds.) (1965), Anreicherungskultur und Mutantenauslese, Zentralbl. Bakteriol. 1. Abt. Suppl. 1, Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, New York.

Starr, M. P., Stolp, H., Trüper, H. G. Balows, A., Schlegel H. G. (eds.) (1981), The Prokaryotes: A Handbook on Habitats, Isolation and Identification of Bacteria, Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York.

Veldkamp, H. (1976), Continuous Culture in Microbial Physiology and Ecology, Meadowfield Press, Durham.

VII. Mecanismos básicos del metabolismo y de la obtención de energía

Crosa, J. H. (1989), Genetics and Molecular Biology of Siderophore-Mediated Iron Transport in Bacteria, Microbiol, Rev. *53*, 517-530.

Gottschalk, G. (1981). The Anaerobic Way of Life of Prokaryotes, in The Prokaryotes: A Handbook on Habitats, Isolation and Identification of Bacteria (Starr, M. P. et al., eds.), Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York.

Gottschalk, G. (1986), Bacterial Metabolism, 2ª ed., Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York.

Harold, F. M. (1986). The Vital Force: A study of Bioenergetics, W. H. Freeman, New York.

Jones, C. W. (1982), Bacterial Respiration and Photosynthesis, Nelson, Walten-on Thames.

Karlson, P. (1990), Kurzes Lehrbuch der Biochemie, 13ª ed., Georg Thieme Verlag, Stuttgart, New York.

Stryer, L. (1990), Biochemie, 4ª ed., Spektrum der Wissenchaft, Heidelberg.

VIII. Fermentaciones especiales

Gunsalus, I. C., Stanier, R. Y. (eds.) (1961), The Bacteria, Vol. II, Academic Press, New York, London.

Reed, G. (editor) (1982), Prescott and Dunn's Industrial Microbiology, The Avi Publ. Comp., Inc., Westpoint.

Rehm, H. J. (1980), Industrielle Mikrobiologie, Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York.

Thauer, R. K., Morris, J. G. (1984), Metabolism of Chemotrophic Anaerobes: Old Views and New Aspects, Symp. Soc. Gen. Microbiol. *36* (II), 123.

Zehnder, A. J. B. (ed.) (1988), Biology of Anaerobic Microorganisms, John Wiley & Sons, Inc., New York.

IX. Transporte de electrones en condiciones anaeróbicas

Blaut, M., Gottschalk, G. (1984), Coupling of ATP Synthesis and Methane Formation from Methanol and Molecular Hydrogen in *Methanosarcina barkeri*, Eur. J. Biochem. *141*, 217.

Postgate, J. R. (1984), The Sulphate-Reducing Bacteria, 2ª ed., Cambridge University Press, London.

Thauer, R. K., Jungermann, K., Decker, K. (1977), Energy Conservation in Chemotrophic Anaerobic Bacteria, Bacteriol. Rev. *41*, 100.

Thauer, R. K., Morris, J. G. (1984), Metabolism of Chemotrophic Anaerobes: Old Views and New Aspects, Symp. Soc. Gen. Microbiol, *36* (II), 123.

Zehnder, A. J. B. (ed.) (1988), Biology of Anaerobic Microorganisms, John Wiley & Sons, Inc., New York.

X. Oxidaciones incompletas y biotecnología microbiana

Crueger, W., Crueger, A. (1989), Biotechnologie-Lehrbuch der angewandten Mikrobiologie, 3ª ed., R. Oldenbourg Verlag, München.

Demain, A. L., Solomon, N. A. (eds.) (1986), Manual of Industrial Microbiology and Biotechnology, Am. Soc. Microbiol., Washington.

Diekmann, H., Metz, H. (1991), Grundlagen und Praxis der Biotechnologie, Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, New York.

Gutcho, S. J. (1973), Chemicals by Fermentation, Noyes Data Corp., Park Ridge.

Mann, J. (1978), Secondary Metabolism, Clarendon Press, Oxford.

Peppler, H. J., Perlman, D. (1979), Microbial Technology, Vol. I y II, Academic Press, New York, London.

Präve, P., Faust, U., Sittig, W., Sukatsch, D. A. (1987), Handbuch der Biotechnologie, R. Oldenbourg-Verlag, München.

Rehm, H. J., Reed, G. (eds.) (1988ff), Biotechnology. A Comprehensive Treatise in 8 Volumes, VCH (Verlagsgesellschaft, Weinheim).

Rose, A. H. (eds.) (1979), Secondary Products of Metabolism, Academic Press, New York, London.

Smith, J. E., Berry, D. R. (1975), The Filamentous Fungi, Industrial Mycology, Vol. I, E. Arnold, London.

Sutherland, I. W. (1982), Biosynthesis of Microbial Exopolysaccharides, Adv. Microbiol. Physiol, *23*, 79.

XI. Bacterias quimio y fototróficas

Clayton, R. K., Sistrom, W. R. (eds.), (1978), The Photosynthetic Bacteria, Plenum Press, New York.

Jones, C. W. (1982), Bacterial Respiration and Photosynthesis, Nelson, Walten-on Thames.

Jones, O. T. G. (1977), Electron Thansport and ATP Synthesis in the Photosynthetic Bacteria in Microbial Energetics (Haddock, B. A., Hamilton, W. A., eds.), Cambridge University Press, London.

Lawlor, D. W. (1990), Photosynthese –Stoffwechsel, Kontrolle, Physiologie, Georg Thieme Verlag, Stuttgart, New York.

Richter, G. (1988), Stoffwechselphysiologie der Pflanzen, 5ª ed., Georg Thieme Verlag, Stuttgart, New York.

Schlegel, H. G., Bowien, B. (eds.) (1989), Autotrophic Bacteria, Science Techn/Springer Verlag, Madison, Heidelberg.

Shively, J. M., Barton, L. L. (1991), Variations in Autotrophic Life, Academic Press, London.

XII. Fijación del nitrógeno molecular

Bothe, H., De Bruijn, F. J., Newton, W. E. (eds.) (1988), Nitrogen Fixation: Hundred Years After, Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, New York.

Hardy, R. W. F., Bottomley, F., Burns, R. C. (eds.) (1979), A Treatise on Dinitrogen Fixation, Wiley, New York.

Postgate, J. R. (1982), The fundamentals of Nitrogen Fixation, Cambridge University Press, London.

Quispel, A. (eds.) (1974), The Biology of Nitrogen Fixation, North-Holland, Amsterdam.

Schaede, R., Meyer, F. H. (1962), Die pflanzlichen Symbiosen, 3ª ed. Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, New York.

XIII. Degradación de los productos naturales

Beck, T. (1968), Mikrobiologie des Bodens, Bayr. Landw. Verlag, München.

Bonner, J., Varner, J. E. (eds.) (1965), Plant Biochemistry, Academic Press, New York, London.

Gibson, D. T. (eds.) (1984), Microbial Degradation of Organic Compounds, Marcel Decker, Inc., New York.

Giesecke, D., Henderickx, H. K. (eds.) (1973), Biologie und Biochemie der mikrobiellen Verdauung, BLV Verlagsgesellschaft, München.

Gray, T. R. G., Parkinson, D. (eds.) (1967), The Ecology of Soil Bacteria, Liverpool University Press.

Hungate, R. E. (1966), The Rumen and Its Microbes, Academic Press, New York, London.

McLaren, A. D., Skujins (eds.) (1971), Soil Biochemistry, Dekker, New York.

Parkinson, D., Waid, J. S. (1960), The Ecology of Soil Fungi, Liverpool University Press.

XIV. Constancia, modificación y transferencia de la información genética

Bachmann, B. J. (1990), Linkage Map of *Escherichia coli* K12, Microbiol. Rev. *54*, 130-197.

Birge, E. A. (1984), Bakterien- und Phagengenetik, eine Einführung. Springer Verlag. Berlin, Heidelberg, New York.

Bresch, C., Hausmann, R. (1972), Klassische und molekulare Genetik, 3ª ed., Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York.

Freifelder, D. (1987), Microbial Genetics, Jones and Bartlett Publ., Boston.

Glass, R. E. (1982), Gene Function. *E. coli* and its Heritable Elements, Croom Helm, London.

Kaudewitz, F. (1983), Genetik. Ulmer Verlag, Stuttgart.

Knippers, R., Fanning, E., Philippsen, P., Schäfer, K. P. (1990), Molekulare Genetik, 5ª ed., Georg Thieme Verlag, Stuttgart, New York.

Lewin, B. (1974), Genes, Wiley & Sons, New York, London.

Lewin, B. (1974, 1977 y 1990), Gene Expression. Vol. I-IV, Wiley & Sons, New York, London and Oxford University Press.

Schumann, W. (1990), Biologie Bakterieller Plasmide, Friedr. Vieweg & Sohn Verlagsgesellschaft, Braunschweig.

Stent, G. S., Calendar, R. (1973), Genética Molecular, Ediciones Omega, S.A., Barcelona.

Strickberger, M. W. (1988), Genética, 3ª ed., Ediciones Omega, S.A., Barcelona.

Winnacker, E. L. (1987), From Genes to Clones, Introduction to Gene Technology, VCH Verlagsgesellschaft, Weinheim.

XV. La regulación del metabolismo

Beckwith, J. R., Zipser, D. (eds.) (1970), The Lactose Operon, Cold Spring Harbor Lab., Cold Spring Harbor, New York.

Cohen, G. N. (1973), El Metabolismo Celular y su Regulación, Ediciones Omega, S.A., Barcelona.

Englesberg, E., Wilcox, G. (1974), Regulation: Positive control, Annu. Rev. Genet. *8*, 219.

Hecker, M., Babel, W. (eds.) (1988), Physiologie der Mikroorganismen, VEB Gustav Fischer Verlag, Jena.

Jungermann, K., Möhler, H. (1980), Biochemie, Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York.

Neidhardt, F. C. (eds.) (1987), *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*. Cellular and Molecular Biology, Am. Soc. Microbiol, Publ., Washington.

XVI. Microorganismos y medio ambiente

Alexander, M. (1971), Microbial Ecology, Wiley, New York.

Atlas, R. M., Bartha, R. (1987), Microbial Ecology: Fundamentals and Applications, 2ª ed., Benjamin Publ. Comp., Menlo Park, California.

Brock, T. D. (1978), Thermophilic Microorganisms and Life at High Temperatures, Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York.

Broda, E. (1975), The Evolution of the Bioenergetic Processes, Pergamon Press, Oxford, New York.

Carlile, M. J., Skehel, J. J. (1974), Evolution in the Microbial World, 24. Symp. Soc. Gen. Microbiol., Cambridge University Press, London.

Cavalier-Smith, T. (1981), The Origin and Early Evolution of the Eukaryotic Cell. Symp. Soc. Gen. Microbiol. *32*, 33.

Ellwood, D. C., Hedger, J. N., Latham, M. J., Lynch, J. M., Stater, J. H. (eds.) (1980), Contemporary Microbial Ecology, Academic Press, New York, London.

Fletcher, M., Gray, T. R. G. (eds.) (1987), Ecology of Microbial Communities, Symp. Soc. Gen. Microbiol. *41*.

Holland, H. D., Schidlowski, M. (eds.) (1982), Mineral Deposits and the Evolution of the Biosphere. Report of the Dahlem Workshop on Biospheric Evolution and Precambrian Metallogeny, Berlin 1980, Springer Verlag, Heidelberg, New York.

Kaplan, R. W. (1978), Der Ursprung des Lebens, 2ª ed., Georg Thieme Verlag, Stuttgart, New York.

Kushner, D. J. (eds.) (1978), Microbial Life in Extreme Environments, Academic Press, New York, London.

Odum, E. P. (1983), Grundlagen der Ökologie. Vol. I: Grundlagen. Vol. II: Standorte und Anwendung, 2ª ed., Georg Thieme Verlag, Stuttgart, New York.

Oparin, A. (1957), Die Entstehung des Lebens auf der Erde, 3ª ed., Deutscher Verlag der Wissenschaften, Berlin.

Riley, M., Anilionis, A. (1978), Evolution of the Bacterial Genome. Annu. Rev. Microbiol. *32*, 519.

Savage, D. C. (1977), Microbial Ecology of the Gastrointestinal Tract, Annu. Rev. Microbiol. *31*, 107.

Schlegel, H. G., Jannasch, H. W. (1981), Prokaryotes and Their Habitats, in The Prokaryotes: A Handbook on Habitats, Isolation and Identification of Bacteria (Starr, M. P. et al., eds.), Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York.

Schleifer, K. H., Stackebrandt, E. (eds.) (1985), Evolution of Prokaryotes. Academic Press, Inc. Orlando.

Schopf, J. W. (eds.) (1983), Earth's Earliest Biosphere, its Origin and Evolution, Princeton University Press, Princeton, N.J.

Shilo, M. (eds.) (1979), Strategies of Life in Extreme Environments, Dahlem Konferenzen, Berlin, Verlag Chemie, Weinheim, Deerfield Beach, Florida, Basel.

Tait, R. V. (1981), Meeresökologie, 2ª ed., Georg Thieme Verlag, Stuttgart, New York.

Tardent, P. (1979), Meeresbiologie, eine Einführung, Georg Thieme Verlag, Stuttgart, New York.

Werner, D. (1987), Pflanzliche und mikrobielle Symbiosen, Georg Thieme Verlag, Stuttgart.

Woese, C. R. (1987), Bacterial Evolution, Microbiol. Rev. *51*, 221.

XVII. Textos útiles

Florkin, N., Stotz, E. H. (eds.) (1962), Comprehensive Biochemistry, Elsevier, Amsterdam, New York.

Gunsalus, I. C. (ed.) (1960-1986), The Bacteria, Vol. I–X, Academic Press, Inc., Orlando.

Starr, The Prokaryotes, H., Trüper, H. G., Balows, A., Schlegel, H. G. (eds.) (1981), The Prokaryotes. A Handbook on Habitats, Isolation and Identification of Bacteria. Vol. I y II, Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York.

XVIII. Historia

Bolle, F. (1954), Mensch und Mikrobe, Safari, Berlin.

Brock, T. D. (1988), Robert Koch. A Life in Medicine and Bacteriology, Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York.

Bulloch, W. (1960), The History of Bacteriology, Oxford University Press, London.

De Kruif, P. (1927), y ediciones posteriores Mikrobenjäger, Orell-Füssli, Zürich.

Dobell, C. (1958), Antonie van Leeuwenhoek and His Little Animals, Russel and Russel, New York.

Freund, H., Berg, A. (1963, 1964, 1966), Geschichte der Mikroskopie, Vol. I–III, Umschau Verlag. Frankfurt.

Grainger, T. H. (1958), A Guide to the History of Bacteriology, Ronald, New York.

Haeckel, E. (1866), Allgemeine Entwicklungsgeschichte der Organismen, Georg Reimer, Berlin.

Kamp, A. F., La Rivière, J. W. M., Verhoeven, W. (eds.) (1959), A. J. Kluyver, His Life and Work, North-Holland, Amsterdam.

Lafar, F. (1904–1905), Handbuch der technischen Mykologie, Vol. I–V, Gustav Fischer Verlag, Jena.

Lechevalier, H. A., Solotarovsky, M. (1974), Three Centuries of Microbiology, Dover Publishers, New York.

Mochmann, H. P., Köhler, W. (1984), Meilensteine der Bakteriologie, Fischer Verlag, Jena.

Nicolle, J. (1961), Louis Pasteur, the Story of His Major Discoveries, Basic Book, New York.

Tomsik, I. (1964), Pasteur und die Generatio spontanea, Huber, Bern.

Van Iterson, G., Den Dooren, De Jong, L. E., Kluyver, A. J. (eds.) (1921-1940), Verzamelde Geschriften van M. W. Beijerinck, Vol. I–VI, Martinus Nijhoff, Delft.

Waksman, S. A. (1953), Sergei N. Winogradsky, His Life and Work, Rutgers University Press, New Brunswick.

XIX. Métodos microbiológicos

Bergmeyer, H. U. (ed.) (1974–1984), Methods of Enzymatic Analysis, 3ª ed., Vol. I–VI, Verlag Chemie, Weinheim, Deerfield Beach, Florida, Basel.

Colowick, S. P., Kaplan, N. O. (eds.) (1970) y sigs.), Methods in Enzymology, Academic Press, New York, London.

Cowan, S. T., Steel, K. J. (1965), Manual for the Identification of Medical Bacteria, Cambridge University Press, London.

Drews, G. (1983), Mikrobiologisches Praktikum für Naturwissenschaftler, 4ª ed., Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York.

Esser, K. (1976), Kryptogamen, Praktikum und Lehrbuch, Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York.

Gerhardt, P. (ed.) (1981), Manual of Methods for General Microbiology, Amer. Soc. for Microbiol., Washington, D.C.

Gibbs, B. M., Shapton, D. A., Skinner, F. A. (eds.) (1968), Identification Methods for Microbiologists, Parte A y B, Academic Press, New York, London.

Hartman, P. A. (1968), Miniaturized Microbiological Methods, Academic Press, New York, London.

Meynell, G. G., Meynell, E. (1970), Theory and Practice in Experimental Bacteriology, Cambridge University Press, London.

Norris, J. R., Ribbons, D. W. (eds.) (1979 y sigs.), Methods in Microbiology, Academic Press, New York, London.

Primrose, S. B., Wardlaw, A. C. (eds.) (1982), Sourcebook of Experiments for the Teaching of Microbiology, Academic Press, New York, London.

Sambrock, J., Fritsch, E. F., Maniatis, T. (1989), Molecular cloning: A Laboratory Manual, 2ª ed., Cold Spring Harbor, New York.

Süßmuth, R., Eberspächer, J., Haag, R., Springer, W. (1987), Biochemisch-mikrobiologisches Praktikum, Georg Thieme Verlag, Stuttgart.

Walhäuser, K. M. (1984), Sterilisation, Desinfektion, Konservierung, Keimidentifizierung, Betriebshygiene, 3ª ed., Georg Thieme Verlag, Stuttgart, New York.

Winkler, U., Rüger, W., Wackernagel, W. (1976), Bacterial, Phage and Molecular Genetics, Springer Verlag, Heidelberg.

Publicaciones periódicas

Advances in Applied Microbiology
Advances in Microbial Ecology
Advances in Microbial Physiology
Annual Review of Biochemistry
Annual Review of Microbiology
Critical Reviews in Biochemistry
Critical Reviews in Microbiology
Current Topics in Cellular Regulation
Developments in Industrial Microbiology
Ergebnisse der Biologie
Fortschritte der Botanik
Progress in Industrial Microbiology
Symposia of the Society for General Microbiology

Revistas

Angewandte Chemie
Annales de L'Institut Pasteur
Antonie van Leeuwenhoek, Journal of Microbiology and Serology
Applied Microbiology
Archives of Microbiology
Biotechnology and Bioengineering
Canadian Journal of Microbiology
Current Microbiology
European Journal of Applied Microbiology
FEMS Microbiology Ecology
FEMS Microbiology Letters
FEMS Microbiology Reviews
Folia microbiologia
International Journal of Systematic Bacteriology
Journal of Applied Bacteriology
Journal of Bacteriology
Journal of General and Applied Microbiology
Journal of General Microbiology
Journal of General Virology
Journal of Molecular Biology
Journal of Virology
Microbiological Reviews
Mikrobiologija
Molecular and General Genetics
Mycologia
Trends in Biochemistry
Trends in Microbiology
Virology
Zeitschrift für Allgemeine Mikrobiologie
Zentralblatt für Bakteriologie und Parasitenkunde I., II. und III. Abteilung

Revistas de divulgación científica

Biologie in unserer Zeit
Chemie in unserer Zeit
Forum Mikrobiologie
Scientific American
Spektrum der Wissenschaft

Vocabulario

para facilitar el significado etimológico de las expresiones especializadas que se utilizan (F = francés, G = griego, I = inglés, L = latín)

A

aboriri (abortus) L = perecer (aborto)
abortivus L = no llegar a desarrollarse totalmente
accipio, accipere L = suponer
acetum L = vinagre
acidus L = ácido
adustus L = tostado, quemado
aër, aëros G = aire
aerugo L = cardenillo
aes, aeris L = mineral
aggrego, aggregare L = reunir, agregar
agilis L = ágil, rápido
aktis, aktinos G = rayo
allos G = de otra forma
amber I = ámbar
ambo L = ambos
amphi G = alrededor
ampulla L = botella pequeña
amylon G = almidón
anabaino, anabainein G = ascender
anapleroo, anapleroun G = completar, rellenar
angeion G = recipiente
annulo, annulare L = reducir a la nada, anular
anthos G = flor
anthrax G = carbón, gangrena, tizón
anti G = contra, anti (como prefijo)
apex, apicis L = punta (de un cono)
aphanizo, aphanizein G = convertir en invisible
applanatus L = aplanado
aqua L = agua
archaios G = original
armillia L = pulsera
arthron G = miembro
askos G = tubo
aspergillum L = recipiente para regar
aspergo, aspergere L = regar
aster G = estrella
attenuare L = atenuar
attraho, attrahere L = atraer
aureus L = dorado
autos G = propio
auxano, auxanein G = multiplicar
axon G = eje

B

bacillum L = bacilo, bastoncillo
baeo G = enano
bakterion G = bastoncillo
ballo, ballein G = echar
basis, baseos G = base
bdallo, bdallein G = ordeñar, chupar
bdella G = sanguijuela
bifidus L = bífido, con dos partes
bini L = cada dos
bioo, bioun G = vivir
bios G = vida
bis L = dos veces
blepharon G = párpado, cilio
bolos G = tiro
bos, bovis L = buey
botulus L = salchicha, intestino
bradys G = lento

C

caedo, caedere L = caer, morir
cancer L = cangrejo
capsa L = caja, cápsula
carbo L = carbón
caseus L = queso
caulis L = pedúnculo, tallo
cereus L = céreo, pringoso
cerevisia L = cerveza, levadura
chaite G = pelo, cerda
cheo G = regar, fundir
chimaera L = quimera, dragón
chimaira G = cabra
chiton G = vestido
chlamys G = abrigo, vestido
chloros G = verde claro, pálido
choane G = embudo
chondros G = terrón, pasta, ternilla
chrona G = piel, color
chronos G = tiempo
chrysos G = oro
chthon, onos G = tierra
chytra G = pote
cilium L = párpado, pestaña
cinereus L = de color gris ceniza

cinnabaris L = color rojo
circino, circinare L = convertir en circular
circulo, circulare L = girar
circulus L = círculo
cisterna L = recipiente de agua subterráneo
citrus L = limonero
classis L = sección clase
clatratus L = enrejado
clavis L = llave
coagulo, coagulare L = dejar coagular
coccum L = núcleo, grano
code F = código
coelum L = cielo, intemperie
colo, colere L = habitar
color L = color
columella L = columna pequeña
combinatio L = combinación
combino, combinare L = combinar
communis L = común
competo, competere L = competir, rivalizar
compleo, completere L = llenar
confluo, confluere L = confluir
coniungo, coniungere L = conjugar
conservo, conservare L = conservar
consortium L = comunidad
contamino, contaminare L = afectar, estropear
convergo, convergere L = convergir
cornutus L = cornudo
corrodo, corrodere L = roer
cortex L = corteza
crassus L = denso, grueso
cremor L = capa mucosa
cribrum L = criba
crista L = cresta, orla

D

daktylos G = dedo
deiknymi, deiknynai G = mostrar
deleo, delere L = destruir, aniquilar
deletio L = aniquilación
dendron G = árbol
derma G = piel
deuteros G = el segundo
dexter L = derecho, diestro
diagnosis G = diferenciación
dicha G = dividido en dos
diktyton G = red
diplous G = doble
dis G = dos veces
diskos G = disco
dispergo, dispergere L = extender, multiplicar
dissolvens L = disolvente
dissolvo, dissolvere L = disolver, liberar
divarico, divaricare L = abrir
duro, durare L = durar, resistir
dysenteria G = disentería

E

edaphos G = suelo
eikosi G = veinte
ekleipo, ekleipein G = omitir
ektos G = externo
endon G = interno
enteron G = vísceras
epi G = sobre
cremos G = vacío, descubierto
ergon G = obra, hecho
eruthros G = rojo
eu G = bueno
excido, excidere L = escindir
extra L = externo

F

facio, facere L = hacer
facultas L = posibilidad
faex, faecis L = sedimento, levadura
fascio, fasciare L = recubrir
fermentum L = levadura,
ferrugineus L = de color de óxido de hierro
ferrum L = hierro
fertilis L = fértil
fervere L = hervir
fervidus L = hirviente, flameante
fibra L = fibra
figo, figere L = fijar
filum L = hilo, tejido
fimbria L = hilo, franja
fimum L = estiércol
flecto, flectere L = torcer
flos, floris L = flor
fluctuatio L = fluctuación, inestabilidad
fluctuo, fluctuare L = fluctuar
fluor L = río, corriente
forma L = forma
fuligo L = hollín, negrura
fulvus L = amarillo rojizo
fungus L = hongo
fusus L = hilo, huso

G

galla L = agalla
gamos G = cópula
ganos G = brillo

gaster G = estómago
generatio L = procreación
genesis G = aparición, causa
genus L = género, especie
gigno, gignere L = procrear
gignomai, gignesthai, gegona G = devenir
globo, globare L = redondear, amontonar
globus L = bola, grumo
gloios G = masa pegajosa
glykys G = dulce
gonos G = vástago
gossypium L = algodón
grandis L = grande
grapho, graphein G = escribir
gratis L = gratis, inútil
gratuitus L = gratis, de balde, inútilmente
griseus L = gris
gyne, gynaikos G = mujer
gyros G = anillo, círculo

H

habitare L = habitar
haima G = sangre
helix G = giro, espiral
helveticus L = suizo
helvus L = amarillo miel
hepta G = siete
hermaphroditos G = hermafrodita, híbrido
herpeton G = animal reptante, reptil
heteros G = el otro (de dos)
heurisko, heuriskein G = encontrar
hexadeka G = dieciséis
hirsutus L = espinoso, hirsuto, sin adorno
holos G = entero
homoios G = igual, parecido
hormao, horman G = poner en movimiento
hyalos G = cristal
hybrida L = híbrido
hydor G = agua
hymen G = piel fina
hyper G = excesivo (como prefijo)
hyphos G = tejido
hypo G = debajo (como prefijo)
hypothesis G = proposición, suposición

I

ictus L = golpe
immunis L = inmune, libre
imperfectus L = incompleto, imperfecto
induco, inducere L = inducir, introducir
infesto, infestare L = atacar, perjudicar
inficio, inficere L = colorear, intoxicar
inhalo, inhalare L = inhalar, respirar
insere, inserare L = introducir, incorporar
insertio L = introducción, incorporación
integratio L = reposición, renovación
intra L = interior
isos G = igual

K

kampylos G = curvado
karpos G = fruto
karyon G = nuez, núcleo
kata G = degradante (como prefijo)
kephale G = cabeza
kineo, kinein G = mover
klados G = rama
kleio, kleiein G = cerrar
klino, klinein G = cerrar
koinos G = conjuntamente
koleon G = vaina
kollybos G = moneda pequeña
konis G = polvo
kopros G = estiércol
kormos G = tronco
koryne G = maza, bastón
krypto, kryptein G = esconder
kyanos G = color azul
kybos G = dado
kyklos G = círculo
kyon G = perro
kystis G = burbuja
kytos G = cavidad, célula

L

labor, labi L = deslizar, caer
laevus L = izquierda, sinistra
lampros G = claro
lateo, latere L = oculto
latus L = amplio
latus, lateris L = página
legnon G = ribete, borde
leichen G = moho, liquen
leptos G = fino, delgado
letalis L = mortal
leukos G = blanco
lignum L = madera
limicola L = que vive en el cieno
limus L = cieno, lodo
lino, linere L = cubrir, untar
lipos G = grasa, sebo
lithos G = piedra

lobos G = lóbulo, trapo
logos G = palabra, enseñanza
lophos G = cerro, penacho
luna L = luna
lux L = luz
lyo, lyein G = resolver

M

macero, macerare L = ablandar, debilitar
marcesco, marcescere L = pudrirse, corromperse
megas G = grande
meion G = menor
mel, mellis L = miel
melas G = negro
meninx G = membrana
mensa L = mesa
merismos G = división
meros G = parte
mesos G = el central
meta G = (como prefijo) significa: alteración
mikros G = pequeño
mitos G = hilo
mixis G = mezcla
mobilis L = móvil
monile L = collar
monos G = solo, único
morphe G = forma
mucor L = moho
murus L = muro, pared
mutatio L = alteración, cambio
muto, mutare L = alterar, cambiar
mutuus L = recíproco, mutuo
mykes G = hongo
myon G = músculo
myxa G = capa mucosa

N

nanus L = enano
nato, natare L = nadar
neco, necare L = matar
necto, nectare L = anudar
nema G = hilo
neura G = tendón
nidulor, nidulans L = que construye un nido pequeño
nidus L = nido
niger L = negro
nomos G = ley
noto, notare L = caracterizar
novellus L = nuevo
novus L = nuevo

O

ochros G = pálido, amarillo
oculos L = ojo
oikos G = casa, economía
okto G = ocho
oligos G = poco
oma G = tumor
omnis L = completo, cada uno
onkos G = hinchazón, tumor
oon G = huevo
operator L = trabajador, funcionario
operor, operari L = trabajar, estar ocupado
opsis G = la visión
organon G = órgano
oryza L = arroz
oscillum L = columpio
osmos G = golpe, impulso
ouron G = orina

P

pagus L = lugar, circuito
paluster L = pantanoso
panus L = tumor
par L = igual, parecido
paro, parare L = preparar
parasitos G = parásito
partior, partiri L = repartir
pathos G = pena, sufrimiento
patior, pati L = sufrir
pecten L = peine
pelos G = lodo
pente G = cinco
perficio, perficere L = terminar
peri G = alrededor
permeo, permeare L = dejar pasar
perone G = alfiler
petra G, L = peña
phagein G = comer
phaino, phainein G = mostrar
phaios G = gris, parduzco
phero, pherein G = llevar
philos G = amigo
phleos G = junco
phobeo, phobein G = asustar
phormos G = cesta
phos, photos G = luz
phthora G = destrucción
phykos G = algas
phyllon G = hoja
physis, physeos G = naturaleza, crecimiento
phyton G = plantas

pikros G = agudo, amargo
pilum L = dardo, jabalina
pilus L = pelo
pino, pinein G = beber
pix, picis L = pez
planes L = caminar
planus L = llano, liso
plaque F = placa, cartel
plasma G = edificio
platto, plattein G = formar, construir
pleko, plekein (plektos) = trenzar
pleura G = lado, costado
plico, plicare L = doblar
pneuma G = aliento
pneumonia G = enfermedad pulmonar
poieo, poiein G = hacer, realizar
pollen L = harina fina
polos G = polo
polys G = muchos
potens L = poderoso, activo
pous, podos G = pie
prodigiosus L = prodigioso, asombroso
promotor L = multiplicador, promotor
promoveo, promovere L = acrecentar, adelantar
pros G = sobre (como prefijo)
prostheka G = apéndice
proteus G = dios griego (dios del mar capaz de asumir diferentes aspectos)
protos G = el primero
pseudo, pseudein G = equivocar
psittakos G = loro
psychros G = frío, fresco
putidus L = podrido, putrefacto
pyon G = pus
pyr, pyros G = fuego
pyren G = núcleo

Q

quasi L = casi, como si
quintus L = el quinto

R

racemus L = uvas
radius L = bastón, rayo
radix L = raíz
ramiger L = con ramificaciones
ramus L = rama, brizna
re- L = re-, volver a (como prefijo)
reciprocus L = recíproco, con reacción
reduplicatio L = duplicación, repetición
replicatio L = repetición, replicación
reprimo, reprimere L = inhibir, reprimir
restringo, restrictus, restringere L = restringir
reticulum L = red pequeña
retro L = atrás
reverto, revertere L = regresar
rhage G = rotura
rhiza G = raíz
rhodon G = rosa
rivus L = arroyo
ruber, rubrum L = rojo
rufus L = rojo
rugosus L = rugoso
rumen L = panza
rumino, ruminare L = rumiar

S

sacculus L = saco pequeño
saeptum L = cercado
salivarius L = mucoso
sapros G = podrir
sarcina L = lío, paquete
sarcos G = carne
schizo, schizein G = dividir
to screen I = cribar, tamizar
secale L = cereales (una especie)
segrego, segregare L = separar, apartar
segregatio L = separación
selene G = luna
sensus L = sentido, sentimiento
sentio, sentire L = sentir, notar
sepo, sepein G = dejar pudrir
sideros G = hierro
situs L = sitio, lugar, posición
skleros G = duro, fuerte
skopeo, skopein G = observar
skotos G = oscuridad
solitus L = común
solvo, solutus L = disolver, disuelto
soma G = cuerpo
sordes L = suciedad
soros G = recipiente, depósito
species L = especie, tipo
speira G = vuelta
sphaira G = bola
spira L = vuelta
sporos G = siembra
staphyle G = racimo
stear G = sebo
stele G = columna
stereos G = sólido, duro, espacial
sterigma G = soporte
sterilis L = estéril

sto, stare L = estar de pie
stolo L = vástago radicular
stratum L = estrato, capa
strepho, strephein G = girar
stringo, stringere L = concentrar
stroma G = base, soporte
stylos G = columna, soporte
styptikos G = que obstruye
submergo, submergere L = hundir, esconder, sumergir
substerno (substratus) L = substrato, situado abajo
subtilis L = fino, delgado, sutil
sucinum L = ámbar
sucus L = zumo, jugo
suppleo, supplere L = suplir, completar
suppressor L = opresor, encubridor
supprimo, supprimere L = evitar, oprimir
suspendo, suspendere L = suspender
symbiosis G = vida en común
syn G = junto a
synecho, synechein G = mantener unidos, mantener cerrados

T

tachys G = rápido
taxis, taxeos G = orden, disposición
teichos G = muro
telos G = fin
tempero, temperare L = temperar, controlar
terminator L = exterminador
tettares G = cuatro
thallos G = rama verde
theion G = azufre
theke G = caja, cajón
therion G = animal
thermos G = cálido
thrix, trichos G = pelo
thylakos G = saco
tithemi, tithenai G = colocar, poner, instalar
tolero, tolerare L = tolerar, soportar
tolype G = ovillo
tomaculum L = salchicha
tome G = corte
tonos G = tensión
toxicon (pharmakon) G = tóxico (fármaco)
transeo, transire L = traspasar
transfero, translatus, transferre L = transferir, trasladar
transitio L = transición, paso
transpono, transponere L = transponer
treis, tria G = tres
tremo, tremere L = temblar
trepo, trepein G = volver
trichos G = pelo (véase thrix)
trope G = cambio, giro
trophe G = nutrición
tropos G = dirección, desvío
tuber L = tuberosidad, bubón
tubulus L = tubo pequeño
turbo, turbare L = turbar
typhos G = fiebre
typos G = cuño, forma

U

ubique L = por todas partes
ultra L = más allá
undula L = onda pequeña
uredo L = tizón sobre plantas
uro, ustus L = quemar, quemado
uva L = paloma

V

valeo, valere L = valer, regir, disponer
varius L = distintos, multicolor
ventriculus L = ventrículo
venus L = belleza, atractivo
versi-color L = coloreado, tornasolado
versus L = cambiado
verto, vertere L = volver
vesicula L = vesícula
vinosus L = vínico
viridesco, viridiscere L = volverse verde
viridis L = verde
virulentus L = virulento
virus L = tóxico, humor
viscidus L = viscoso, pegajoso
vitis L = vid
vitreus L = vítreo
vitrum L = vidrio
vivus L = vivo, viviente
volumen L = rollo, remolino
voluto, volutare L = girar
voro, vorare L = devorar

X

xylon G = madera

Z

zoon G = organismo
zygos G = yugo, tiro, puente
zyme G = levadura, fermento

Índice alfabético

los números en **negrita** indican las páginas en que se trata el tema con más detalle; los números seguidos de f remiten a una figura o una tabla de la pàgina

A

A_2 de la gripe, virus, 149f
Abono verde, 441
Absidia coerulea, 469
Acción bacteriostática, 222
Aceptor de electrones, 243, 274
Acetaldehído-deshidrogenasa, 302
Acetato, 318f
  biosíntesis, 333f
  como sustrato, 277
  fermentación, 328, 329f
  formación, 357
Acetato-descarboxilasa, 326
Acetato-quinasa, 247, 293, 295, 329, 319, 326, 333
Acético, formación, **363**, 365
Acetil-CoA, vía reductiva, **334**, 347, 356, 407, 609
Acetil-CoA-carboxilasa, 575
2-Acetil-lactato-descarboxilasa, 320
Acetil-lactato-sintetasa, 319
Acetileno, reducción, 449
Acetilfosfato, 246f
Acetilglucosamina, 17
N-Acetilglucosamina, 51, 52, 53f, 54
N-Acetilmurámico, ácido, 147
Acetoacetil-CoA, 246f
Acetobacter, 15f, 90, 96, 197, 385f
  aceti, 51, 64, 364
  acidophilum, 364
  pasteurianum, 74, 364
  xylinum, 364, 365, 455
Acetobacterium woodii, 358, 400
Acetogénicas, bacterias, 274, 358, 400
Acetohidroxiácido-sintasa, 570
Acetoína, 319
  formación, 316, 317, 319
Acetona, 12, 243, 326
Acetona-butanol, fermentación, 328f
Acholeplasma, 98, 132
Achromatium, 22, 77, 98
  oxaliferum, 77f, 396
Ácida, masa, 310
Acidaminococcus, 96
Acidianus ambivalens, 351
  brierleyi, 351
Acidificación, 232
Ácido(s), 73
  acético, 232
  acético, bacterias del, 12, 363
  N-acetilmurámico, 53f
  6-aminopenicilánico, 380
  asparagínico, 139
  benzoico, 233
  benzoico, degradación, 485
  bromhídrico, 231
  butírico, 272
  2-ceto-3-desoxigalactónico, 62
  2-ceto-3-desoxioctónico, 60
  cítrico, 12, 232, 238, 366, 369, 371
  cítrico y *Aspergillus niger*, 368f
  desoxirribonucleico, 2, 27, *véase también* DNA
  desoxirribonucleico, estructura, 29f
  diaminobutírico, 52
  diaminopimélico, 52, 58, 131
  LL-diaminopimélico, 53
  m-diaminopimélico, 52
  dicarboxílicos, 444
  dicarboxílicos, ciclo, 277f
  dipicolínico, 80, 81f
  fólico, 131
  fórmico, 233
  fosfórico, **27**, 76
  fumárico, 367
  glioxílico, ciclo, 277
  glucónico, 366, 367
  glucurónico, 461f
  glutámico, 52
  glutámico, fermentación, 329
  glutámico, producción, 13
  D-glutámico, 52
  L-glutámico, formación, 372, 373f
  grasos de la panza, 459
  grasos, degradación, 313
  grasos saturados, 283
  guanílico, 373
  ß-hidroxibutírico, 74, 75
  ß-hidroxivaleriánico, 75
  húmicos, 604
  inosínico, 373
  itacónico, 366, 370
  láctico, 12, 100, 179, 232, 367
  láctico, bacterias del, 12, 100, 195, 308, *véase también* Lactobacilos
  láctico puro, 310
  lisérgico, 187, 383
  málico, 366
  micólico, 104
  murámico, 52, 131
  murámico-pentapéptido, 56
  nalidíxico, 43
  nicotínico, 241f
  nítrico, acción mutagénica, 499f
  nucleicos y antibióticos, 225
  orgánicos, producción, 366
  ortofosfórico, 9
  oxálico, 368, 370
  pirúvico, 238
  pirúvico, descarboxilación, 238
  poli-ß-hidroxibutírico, 74, **75f**, 76f, 388
  poli-hidroxibutírico, 73
  producción por hongos, 370
  propiónico, 75, 310
  resistencia, 103
  ribonucleico, 2, *véase también* RNA
  sórbico, 233
  sulfanílico, 225

  sulfhídrico, **77f**, 428
  sulfhídrico en la panza, 459
  sulfhídrico y fotosíntesis bacteriana, 428
  sulfúrico, producción, 394
  tartárico, 232
  teicoico, 54
  tricarboxílicos, **238**
  tricarboxílicos, ciclo, 237f, 238, 241, **256**, 257f, 277f, 370, 424, 574, 575
  tricarboxílicos, ciclo reductivo, 407, 609
  urónico, 62
Acidófilas, bacterias, 197
Acidotolerantes, bacterias, 197
Acil-AMP, 246f
Acilasa, 375
Acinetobacter, 94f, 96, 100
  calcoaceticus, 100, 479
  calcoaceticus y formación de cetilpalmitato, 480f
Acinetos, 140
Acné, 311
Aconitasa, 223, 257f, 369
Aconitato-hidratasa, 256
Acrasiales, 172
  ciclo biólogico, 175
Acrasina, 175
Acrasiomicetos, **172**, 175
  ciclo biológico, 172, 174f
Acriloíl-CoA, vía del, 313
Actinomicetos, 13, 75, 100, **105**, 106f, 376, 445
Actinomicina, 382
  D, 225, 381f
Actinomicosis, 105
Actinomyces, 96
  bovis, 105
Actinoplanes, 96, 105, 106f, 108
Activadores plasmagénicos tisulares específicos, 545
Actividad catalítica, modificabilidad, 240
Adaptación fenotípica, 494
Adenil-quinasa, 247
Adenilato-ciclasa, 562
Adenina, 27, 28, 30, 39, 40
Adenosindifosfato, 247
Adenosinmonofosfato cíclico, 175
Adenosintrifosfato, *véase* ATP
Adenovirus, 145, 149f
Adición, reacción de, 374
ADP, 247
Aerobactina, 535
Aeróbicas, bacterias, 72f, 98
Aeróbicos estrictos, 195
  obligados, 195
Aerobios, efecto tóxico del oxígeno, 272
Aeromonas, 97
  hydrophyla, 320
Aerotactismo positivo, 72
Aerotaxis, 71
Aerotolerantes, 195
Aflatoxina, 231, 383
Agallas de las raíces, 162
Agar, 196
  degradación, 467
Agaropectina, 467
Agarosa, 467
Agave, 301, 302
Agmatina, 488
Agotamiento, siembra por, 207f
Agrobacterium, 94f, 96, 112
  tumefaciens, 112, 162f, 163
Agua(s) a saturación, presión de vapor, 227f
  corrientes, **592**
  en medios de cultivo, 198
  estratificación, 589
  marina, bioelementos, **12f**
  potables, análisis, 315
  residuales, 546
  residuales, depuración, 486, 593
  residuales, producción, 586
Ahumado, 232
Aireación, 199
Aislamiento directo, 204
D-Alanina, 52, 56, 131
L-Alanina, 52
Alanina, síntesis, 282f
L-Alanino-deshidrogenasa, 280
Alcaligenes, 94f, 96, 112
  eutrophus, 70f, 75f, 112, 260, 388, 389f, 394f, 401f
  eutrophus, degradación de la glucosa, 254f
  eutrophus y fructosa, 402
  faecalis, 385f
  hidrogenophilus, 401f
  latus, 446, 447f
Alcanos, degradación, 478, 480f
  oxidación, 261
Alcohol coniferílico, 471f
  obtención por fermentación, 300
Alcohol-deshidrogenasa, 243, 244, 296, 302, 365
Aldehído, ciclo de la ribulosamonofosfato de fijación del formaldehído, **476**, 477f
Aldehído-oxidasa, 273
Aldolasa, 252, 304, 306, 308, 405
Aldosa-1-fosfato, 246f
Alfalfa, nódulos, 444f
Algas verdes, espectros de absorción, 420f
Alginatos, 385
  utilización, 385f
Algodón mercerizado, 455
Alimentos a bajas temperaturas, 232
  conservación, 292
  desecación, 232
  esterilización química, 230
  microbiología, **231**
  transformación, 292
Aliso, 445
Almidón, 9, **73**, 74
  degradación, 462
  hidrólisis, 13
Aloficocianina, 137
Alquilantes, agentes, 158, 501
Aluminio, 10
Alysiella filiformis, 123f
Amanita muscaria, 383
  pantherina, 383
  phalloides, 383
Amanitatoxina, 383
Amarilleamiento de los limoneros, 134
Ambiente, medio, 582
Ames, test de, 510, 511f
Amilasa, 13, 300, 463
α-Amilasa, 386
  utilización, 387f
Amilo-1,6-glucosidasa, 463
Amilobacter, 90
Amilopectina, 74, 462
  enzimas degradativos, 464f
Amilosa, 73, 462, 463f
  enzimas degradativos, 464f
Amilosa-1,6-glucosidasa, 462
Aminación directa, 280
Aminoácido-oxidasa, 477
Aminoácidos, 194
  aromáticos, familia, 572
  azufrados, 10
  producción, 372

  síntesis, 280, 282f
  transformación, 487f
Aminoacil-AMP, 41
Aminoacil-RNAt, 225
Aminoacil-RNAt-sintetasa, 41
4-Aminobenzoato, 224f
2-Aminopurina, 500
  acción mutagénica, 499f
Amital, 267
Amoebobacter, 78, 98, 411f, 413
  roseus, 61f
Amoniaco, 441
Amonificación del nitrato, 339, **341**
  y degradación de proteínas, 488
Amonio, 300
  a nitrato, transformación, 390
  oxidación, 9, **390**, 391
Amonio-monooxigenasa, 391
AMP, *véase* Adenosinmonofosfato
Ampicilina, 507
Ampliación del DNA plasmídico, 528
Ampullariella, 105
Anabaena, 98, 136
  azollae, 137, 446
  cylindrica, 424
Anabolismo, 236
Anaeróbicas, bacterias, 98, 601f
  cadena trófica, 454
  facultativas, bacterias, 449
  Gram negativas, bacterias, 114
  respiración, 337, 361
Anaeróbicos, cultivo, 202
  estrictos, organismos, 344
  facultativos, **97**, 195
  obligados, 195
Anaerobios, efecto tóxico del oxígeno, 272
  transporte de electrones, 273
Anaerobiosis y ATP, 298
  y degradación de productos naturales, 453
Anafase, 18f
Análogo(s) de bases, 500
  estructural, 224
Anapleróticas, reacciones, 274
  vías, 238
Anaranjado de acridina, 86
Ancalomicrobium, 98, 128f, 129
Anfibolismo, 236
Anfitricos, 65
Anhídrido carbónico, 7, 116, 318, *véase también* CO_2
  carbónico e hidrógeno, 332
  carbónico en medios de cultivo, 198
  carbónico, fijación, 311, 403, 408, 423
  carbónico, fijación autotrófica, 576, 609
  carbónico y atmósfera, 8
  carbónico y bacterias, 389
  carbónico-deshidrogenasa, 357
Animal(es) gnotobiónticos, 599
  reino, 1, 4f
Anóxicas, condiciones, 337
Anoxigénicas fototrofas, bacterias, 78
Anoxigénicos, organismos, 447f
Antagonismo, 225
Anteridios, 171
Antibióticos, 38, 105, 223
  acción, 379
  bacterias indicadoras, 377f
  como virutas metabólicas, 376
  demostración de la producción, 376
  determinación, 378f
  espectro de acción, 377f
  mecanismo de resistencia, 533
  mutantes superproductores, 382
  polipeptídicos, 109, 223, 382
  producción, 13, 375
  prueba por estría, 377f
  y ácidos nucleicos, 225
  y síntesis proteica, 225
Anticuerpos monoclonales humanos, 545
  síntesis, 13
Antígeno(s) H, 69
  O, 69
  síntesis, 13
  T, 164
Antimetabolito(s), 224, 500
  degradación constitutiva, 578
  método, 578
  mutantes resistentes frente a un, 579f
  resistencia frente a un, 578
Antiporte, 286
Antisepsia, 226
Antraceno, degradación, 475
Antrax, 109
Antropogénicos, compuestos, degradación, **485**
Aparato de Golgi, 21
Apareamiento de los cromosomas homólogos, 19f
Aphanizomenon flos-aquae, 78
Aporrepresor, 558
Apotecio, 182, 183f
APS-reductasa, 345f
Aquaspirillum, 94f, 97, 112
  autotrophicum, 401f
  itersonii, 117
  serpens, 67f, 117
Arabinogalactanos, 9, 104
Arabinosa, 104
L-Arabinosa, 461f
Arabinosa-3-hexulosa-6-fosfato, 476
Árbol(es) del paraíso, 445
  enfermedades tumorales, 186
  filogenético, 1, 3f, 93f
  genealógico filogenético de las bacterias, **90**
Archaeoglobus, 344
Archangium, 97, 126f
Arginina, 163, 224f
  síntesis, 282f, 554
Arilcarotenoides, 421
Aromáticos, compuestos, rotura del anillo, 481
  compuestos, rotura meta del anillo, 482
  compuestos, rotura orto del anillo, 482, 483f
  compuestos, vías degradativas convergentes, 482
  compuestos y oxígeno, 481
Arpergillus niger, 12
Arqueobacterias, 5, 52, 92, 93f, 97, **114**, 344, 446
  clasificación, 115
  coenzimas, 115
  membrana citoplasmática, 115
  pared celular, 115
  reducción de azufre, 351
  transformación energética, 116

- Arrozales, 137, 341, 351, 453
  - y cianobacterias, 447f
- Arseniato, 223
- *Arthrobacter*, 74, 96, 84, 100, **102**, 392
  - *atrocyaneus*, 87
  - *globiformis*, 84
  - *polychromogenes*, 87
  - *pyridinolis*, 103f
- Artrósporas, 170, 171f
- Ascas, 181
  - desnudas, 183
- Ascocarpio, 182, 183f
- Ascogonio, 181
- Ascomicetos, 181
  - ciclo biológico, 181
  - fase sexual, 181
  - homotálicos, 182f
- Ascóspora, 181
- Asepsia, 226
- Asilomar, conferencia de, 546
- Asimilación de sustratos orgánicos, 347
  - del nitrato, 342
- Asociación sintrófica, 594
- Asparagina, síntesis, 282f
- Aspartato, aminoácidos de la familia, biosíntesis, 572f
  - síntesis, 282f
- Aspartato-quinasa, 571
- Aspergilales, 376
- *Aspergillus*, 170, 185, 186f, 387f, 468
  - *flavus*, 231, 383
  - *glaucus*, 198
  - *itaconicus*, 370
  - *niger*, 35, 367, 369, 372, 387f, 464, 465
  - *niger* y ácido cítrico, 368f
  - *oryzae*, 383, 387f, 464
  - *parasiticus*, 383
  - *terreus*, 370
  - *wentii*, 464
- *Asticcacaulis*, 98, 129
- Atmósfera anóxica, 606
  - terrestre oxidante, 609
  - terrestre primitiva, 606
  - y anhídrido carbónico, 8
- ATP, 237, 238, 245, 246f, 250, 286, 428
  - regeneración, 116, 245, 246, 271, 437
  - y condiciones anaeróbicas, 298
  - y fermentación, 274, 292
- ATPasa, 284, 534
  - F_1, 271
- ATP-sintasa, 21, 45, 247, 260, 268, 269, 271, 287
- ATP-sulfurilasa, 345
- Atropina fúngica, 383
- *Aureobasidium pullulans*, 385f
- Aureomicina, 105, 382
- Autocatalítico multiplicativo, sistema, 212
- Autoclave, 227
  - tiempo de esterilización, 228f
- Autoinductor, 322
- Autorradiografía, 26
- Autótrofas oxidadoras del hierro, bacterias, 113
- Autotrofia estricta, 398
- Autótrofos, organismos, 203
- Auxinas, 163
- Auxótrofos, mutantes, 281
  - organismos, 195
- Azaquinonas, 87
- *Azolla*, 137, 446
- *Azomonas*, 96
  - *agilis*, 447f
- *Azorhizobium caulinodans*, 442, 444f
- *Azospirillum*, 94f, 97
  - *lipoferum*, 447f, 596
- *Azotobacter*, 15f, 84, 90, 96, 205, 261, 466
  - *chroococcum*, 35, 61f, 446, 447f
  - *paspali*, 447, 596
  - *vinelandii*, 385f, 447f, 449
- Azúcares como sustancias nutritivas, 9
  - en la conservación, 232
- Azufre, 77
  - almacenamiento, 413
  - bacterias del, 428
  - bacterias filamentosas del, 396
  - bacterias oxidadoras del, 396f
  - ciclo, 10, 11f
  - compuestos reducidos, 394
  - depósitos, 605
  - en el agua marina, 12f, 605
  - obtención, 195
  - oxidación, 11f
  - oxidación de compuestos, 395, 396f
  - oxidación de compuestos reducidos, 394
  - reducción, 337, 350
  - respiración, 338f, 350
  - respiradores de, 117
  - yacimientos, 348
- Azul de metileno, 86
  - de toluidina, 76

B

- B_{12}-coenzima-proteína, 333
- Baciláceas, 65, 323
- *Bacillus*, 24, 79, 79, 81, 84, 102, 108, 112, 199, 401f, 466, 468
  - *anthracis*, 62, 108
  - *cellulosae-dissolvens*, 458
  - *cereus*, 81, 83f, 108, 227f
  - *cereus mycoides*, 82, 109, 110f
  - *circulans*, 15f, 83, 109
  - *coagulans*, 15f
  - *laterosporus*, 78, 109f
  - *licheniformis*, 83, 108, 109, 341
  - *macerans*, 109
  - *medusa*, 78
  - *megaterium*, 15f, 26f, 54, 62f, 67, 76f, 82, 83f, 108, 109f, 129f, 158f
  - *pasteurii*, 109, 489
  - *polymyxa*, 74, 109f, 320, 446, 447f
  - *sphaericus*, 109f
  - *stearothermophilus*, 15f, 109, 199, 227f
  - *subtilis*, 15f, 51, 62, 83, 108, 109, 320, 387f
  - *subtilis*, degradación de la glucosa, 254f
  - *subtilis*, tiempo de reducción decimal, 227f
  - *thuringiensis*, 78, 108, 109f
- Bacilos, 22, 23, 25f, **96**
  - aeróbicos Gram negativos, 112
  - curvados, 97
  - del heno, 109
  - formadores de endósporas, 96, 108
  - Gram negativos, 97, 111
  - Gram positivos no esporulados, 96, 100
- Bacitracina, 382
- Bacteriano, núcleo, 25
  - virus, 144, 151
  - virus, aislamiento, **151**
- Bacterias, 97
  - de la panza, 459

  de vida libre y fijación de nitrógeno, 447f
  fototrofas, metabolismo, 423
  metabolismo, 423
  oxidativas del sulfhídrico incoloras, 124f
  rojas, metabolismo, 423
  tasa de incremento, 219
  y α-amilasas, 463
  y temperatura, 199
Bactericidas, agentes, 222
Bacteriocinogénicos, factores, 534
Bacterioclorofila, 412, 419, 431
  a, 415, 432
Bacteriófago(s), 144f, 146f, *véase también* Fago
  aislamiento, 151
  DNA, 153
  morfología, 152, 153f, 154f
  PMB, DNA, 28f
  RNA, 153
  T de *Escherichia coli*, 152
  T4, 156f
  tipo fr, 153
  tipo Qß, 153
  tipo R17, 153
Bacteriofeofitina, 431, 432
Bacterioglea, 64
Bacteriorrodopsina, 439
Bacteriostático, 222
Bacterium prodigiosum, 85f, 87, 315
Bacteroides, 93f, 97, 314, 442
  fragilis, 114
  succinogenes, 114
Balistósporas, 190
Banco de dilución, 208f
Barbecho, 441
Bases análogas, 500
  pirimidínicas, 27, 28
  púricas, 27, 28
Basidio, 188
Basidiomicetos, 188
  ciclo biológico, 188f
Basidiósporas, 188
Basura, vertederos, 454
Bauxita yacimientos, 606
Bdellovibrio, 65, 97, **117**
  bacteriovorus, 117, 118f, 130
  grupo, 94f
Beggiatoa, 11f, 77, 94f, 98, 124f
  alba, 396
  gigantea, 77f
Beijerinck, figuras de respiración, 72f
Beijerinckia, 96
Benceno, degradación, 485
Beocitos, 140
BIF, 604
Bifásico, crecimiento, 214f
Bifidobacterium, 96, 100, 304, 308, 314
  bifidum, 307
  fermentación, 307
Bifitanilo, 115
Biliverdinas, 444
Bioautografía, 580
Biocatalizadores, 239
Biocenosis, 582
Biodegradable, material, 388
Biodigestor, 357, 592f, 593
Bioelementos del agua marina, 12t
Biogás, 357
Biomasa, 388
  del suelo, 454f
  limitación de la producción, 11
  mineralización aeróbica, 454
Biotecnología microbiana, 363
Biotina, 241f
  función, 241f
Bioyogur, 310
Biuret método, 210
Blakesleea, 178
Blastobacter, 98
Blefaroplasto, 170
Borrelia, 97, 121
  allidum, 121
  anserina, 122
  burgdorferi, 122
  recurrentis, 122
Borreliosis, 122
Botulismo, 332
Bradyrhizobium japonicum, 442, 444f, 450
Brevibacterium, 96
  divaricatum, 372
  linens, 103
Bromouracilo, 500
2-Bromouracilo, acción mutagénica, 499f
Bronconeumonía de la rata, 133f
Brucella, 96
Butano, degradación, 477
Butanodiol, 13
2,3-Butanodiol, 109, 318f, 319, 320
Butanodiol-deshidrogenasa, 320
Butanol, 12, 243, 326
Butirato, 114, 326
Butiril-CoA-deshidrogenasa, 326
Butyrivibrio, 97, 114, 119
  fibrisolvens, 331
Byssochlamys nivea, 229

C

C_2 piruvato, 276
C_{20}, 115
C_{40}, 115
C_{55}-polisoprenoide, 65
Cabellos de monte, 143
Cadaverina, 488
Cadena(s) alimentaria anaeróbica, 291, 352
  parafínica, 478
  polipeptídicas, enlaces, 37f
  polisacáridas O-específicas, 59
  respiratoria, 237, 241, 247, **258**, 259, 265f, 266f
  respiratoria, componentes, 260, 262f
  respiratoria en membrana de bacterias, 266f
  respiratoria, fosforilación, 268
  respiratoria, inhibidores, 267
  respiratoria, ordenación de los grandes complejos proteicos, 270f
  respiratoria productora de ATP, 238
  respiratoria y sistemas redox, 265
  transportadora de electrones, 259, 609
  trófica anaeróbica, 454
Caja de Shine-Dalgarno, 498
Calcio, 10
Calcos, transferencia, 495f
Caldariella acidophila, 395
Caldo nutritivo, 488
Calor húmedo, 227
  seco, 229
Calothrix, 98, 124f, 136f
Calvas, 158f
Calvin, ciclo, 403, 407f, 609
Cáñamo, enriado, 467

- Canavanina, 224f
- Cáncer, 164
  - vegetal, 162
  - y virus, 162
- Cancerígenas, sustancias, 510
- *Candida*, 185
  - *albicans*, 304, 599
  - *lipolytica*, 479
  - *pulcherrima*, 85f, 87
  - *reukaufii*, 87
  - *rhodotorula*, 75
  - *tropicalis*, 479
  - *utilis*, degradación de la glucosa, 254f
- Cápsido, 145
  - icosaédrico, 150f
- Capsómeros, 145
- Cápsulas, 61, 137
  - bacterianas, 62f
- Características
  - metabólico-fisiológicas, 89
  - morfológicas, 89
- Carbohidratos degradación, 238
  - fermentación, 292
- Carbolfucsina, 104, 107f
- Carbomicina, 382
  - A, 382
- Carbonato cálcico, depósitos, 605
  - producción, 351
  - reducción, 337, 357
  - respiración, 338f, 354
- Carbones, 453
- Carbonil-cianuro-trifluorometoxi-fenilhidrazona, 287
- Carbono, 453
  - ciclo, 7, 8f
  - compuestos, 453
  - en el agua marina, 12f
  - fuentes, 193, **203**
  - mineralizado, 7
  - orgánico arcaico, 608
- Carboxibacterias, 403
- Carboxilación de ácidos C_3, 275
  - reacción de, 404
- Carboxisomas, 79, **139**
- Carbunco, 109
- Carcinoma, 146f
- Carga energética, estado, 577
- Cariogamia, 170
- Cárnicos, productos, 310
- Carotenoides, 13, **84**, 384, 419, **421**, 426, 433
  - formación, 86
- Carrier, 286
- *Caryophanon*, 96
  - *latum*, 101f
- Caseína, coagulación, 309
- Casuarina, 445
- CAT oxidativo, 347
- Catabolismo, 236
- Catabolito, represión por, **278**
- Catalasa, 110, 273, 302, 311, 313, 323
- Catecol, 485f
  - y degradación de anillos aromáticos, 481
- Cationes de radicales aromáticos, 472
- *Caulobacter*, 65, 98, 128f, 129f
  - *vibrioides*, 129
- *Ceanothus*, 445
- Cefaloridina, 381
- Cefalosporina, 115, 226, 380
  - C, 381f
- Cefalotina, 381
- *Cellulomonas*, 96, 102, 457
- Celobiosa, 455
- Celulares, impedimento a la síntesis de componentes, 224
- Células animales, introducción de DNA, 545
  - dadoras Hfr, 523
  - diploides, 18f
  - esporuladas, número, 82
  - estado energético, 576
  - estándar, 209
  - eucarióticas, 17, 18f
  - flexibles, 97
  - lesión de las capas superficiales, 223
  - oncogénicas transformadas, 164
  - procarióticas, 22, 23f
  - somáticas diploides, 19
  - vegetales, 18f
  - vegetales, introducción de DNA, 545
  - viables, recuento, 210
- Celulasa, 386, 455-457, 465
  - degradación aeróbica, 456
  - regulación de la síntesis, 455
  - utilización, 387f
- Celulíticas, bacterias aeróbicas, 457
- Celulosa, 9, 13, **51**, 454, **455**
  - degradación anaeróbica, 457
  - descomposición, 105
  - fermentación, 291
  - nativa, 455
  - rotura enzimática, 455
  - tipo I, 455
  - tipo II, 455
- Celulosomas, 457
- Cementos, 392
- Cenozigoto, 171
- Centro catalítico, 239
- Cepa, 90
- *Cephalosporium*, 380
- Cerveza, 12
  - fabricación, 300
  - levadura, 300
- Cetilpalmitato, 479
  - formación, 480f
- 2-Ceto-3-desoxi-6-fosfogluconato, 247
  - vía del, **252**, 253f, 254f, 301
- *Chaetomium*, 186
- Chalcocita, 398
- Charcas, 588
- *Chlamydia*, 98
  - enfermedades, 603
  - *psittaci*, 131
  - *trachomatis*, 131
- *Chlorobium*, 11f, 98
  - fijación de anhídrido carbónico, 423
  - *limicola*, 415, 416f-418f
  - *phaeobacteroides*, 415
  - *thiosulphatophilum*, 407
  - *vibrioforme*, 415, 416f
- *Chlorochromatium*, 416f
  - *aggregatum*, 415
- *Chloroflexus*, 98, 134, 416, 419
  - y oscuridad, 424
- *Chloroherpeton*, 98
- *Chloronema*, 98
- *Choanephora cucurbitarum*, 178
- *Chondrococcus columnaris*, 128
- *Chondromyces*, 97, 126f
  - *apiculatus*, 127f
- *Chromatium*, 11f, 46, 65, 72, 77, 94f, 98
  - *okenii*, 22, 48f, 65, 66, 76f, 411f, 412f
  - *vinosum*, 411f, 413
  - *warmingii*, 411f, 412f
- *Chromobacterium*, 90
  - *iodinum*, 85f
  - *violaceum*, 85f, 87

Cianobacterias, 2, 22, 65, 77, 78, 93f, 98, 135, 136f, 203, 409, 449 609, 610
  chroococcales, 135
  deslizamiento, 135
  espectros de absorción, 420f
  fijadoras de nitrógeno, 10, 446, 447f
  filamentosas, 607
  floración, 589
  fotosintéticas, 6, 438
  fototróficas, 124f
  fototróficas oxigénicas, 78
  metabolismo anaeróbico, 141
  pleurocapsales, 135
  ventajas selectivas, 11
  y BIF, 604
  y fijación de nitrógeno, 447
Cianocobalamina, 312
Cianofíceas, 98
Cianoficina, gránulos, **78**, 139
Cianosis, 343
Cianuro, 223, 267
Ciclo de Calvin, 403, 407f, 609
  de Krebs-Kornberg, 277
  de la materia, 7
  de la ribulosabifosfato, 403
  de la ribulosamonofosfato, de fijación, 476, 477f
  de la xilulosamonofosfato, de fijación, 476
  de los ácidos dicarboxílicos, 277f
  de los ácidos tricarboxílicos, 277f, 424
  del ácido glioxílico, 277
  del azufre, 10, 11f
  del carbono, 7, 8f
  del fósforo, 9
  del nitrógeno, 9, 10f
  ruminohepático, 460
D-Cicloserina, 115
Cilíndricas rectas, bacterias, 96
Cilios, 22
Círculo rodante, mecanismo, 531
Cisteína, 10
  síntesis, 282f
Cisternas, 20
Cistos, **84**
Cit bc1, complejo, 432
Citocromo, 45, 86, 261, 302, 303, 311, 323, 435
  a, 393
  b, 265, 346
  c, 262, 263, 346, 267, 393, 395
  función, 241f
Citocromo-c-oxidasa, 267
Citocromo-c-reductasa, 223
Citocromo-oxidasa, 223, 262, 265, 265, 266f, 272, 273
Citocromo-reductasa, 265, 266f
Citoplasma, 20, 36
Citoquinina, 163
Citosina, 27, 28, 30, 39, 40
Citrato férrico amónico, 290
  utilización, 317
Citrato-sintasa, 256, 257f, 278, 575
Citrobacter, 314f
Citromyces pfefferianus, 368
Cladothrix dichotoma, 113
Clamidias, 93f, 98, **131**
Clamidósporas, 170, 171f
Clasificación, 90
  artificial, 90
  filogenética, 90
  natural, 90
Clave de identificación, 90
  de traducción, 40
Claviceps paspali, 383
  purpurea, 186, 187f, 383
Cleistotecio, 182, 183f, 185
Clonación, técnica nuclear, **539**
Cloranfenicol, 225, 381
Clorobactina, 422
Clorobiáceas, 134, **415**, 416f, 425
  características, 410f
  distribución, 425
  fotorreacción, 433
  poder reductor, 433
  transporte fotosintético de electrones, 432
Clorobios, 423
Clorofila, 419, 433
  a y bacterioclorofilas, 421f
Clorofila-proteína, complejo, 429
Cloroflexáceas, 134, **416**, 423
Clorofoxáceas, características, 410f
Cloromicetina, 105, 381, 381f
Cloroplastos, 20, **21**
  transporte de protones, 436f
Clorosoma, 415
Cloruro de cesio, 32
Clostridios, 74, 302, 384, 446, 601f
  aislamiento, 324
  anaeróbicos estrictos, 291
  características fermentativas, 325f
  como patógenos, 332
  condiciones anaeróbicas, 323
  enriquecimiento, 324
  fermentación, 324
  metabolismo fermentativo, 323
  peptolíticos, 324
  sarcolíticos, **110**, 324, 464
  sustratos, 324
  ureolíticos, 110
  y acetato, 327f
  y acetona, 327f
  y ácido butírico, 325f
  y ácido caproico, 325f
  y ácido propiónico, 325f
  y butanol, 325f
  y n-butanol, 327f
  y butirato, 327f
  y etanol, 327f
  y fermentación, 327f, 328
  y fermentación butirato-butirol, **323**
  y 2-propanol, 327f
  y reacción de Stickland positiva, 325f
Clostridium, 79, 83f, 108, 199, 205, 245, 261, 323, 467
  acetabularium, 326
  aceticum, 110, 334, 358
  acetobutylicum, 110, 323, 324, 327
  acetobutylicum y fermentación de la glucosa, 328f
  acidi-urici, 110, 332
  botulinum, 110, 231, 332
  butyricum, 74, 110, 324, 327, 329
  cellobioparum, 457
  cellulosae-dissolvens, 110
  cylindrosporum, 332
  formicoaceticum, 263, 332, 334
  histolyticum, 110, 323, 332
  kluyveri, 323, 328
  oroticum, 326t
  pasteuriana, 110
  pasteurianum, 110, 323

  - *septicum*, 332
  - *sporogenes*, 110, 330
  - *tetani*, 110, 332
  - *tetanomorphum*, 329, 330f
  - *thermoaceticum*, 263, 323, 332, 333f, 334, 358
  - *thermocellum*, 457
  - *thermohydrosulfuricum*, 323, 464
  - *thermosulfurogenes*, 464
  - *tyrobutyricum*, 329
- CO deshidrogenasa, 333
- CO_2, asimilación autotrófica, 346, 356
  - fijación autotrófica, 407
  - molécula aceptora, 405
  - reducción, 337
- CoA-acilasa, 258
- CoA-transferasa, 312, 313, 326, 482
- Cobalamina, 241f
- Cociente P/Q, 267
- Cocos, 96
  - anaeróbicos, 99, 100
  - formadores de endósporas, **96**, 108
  - Gram negativos, 96, 99
  - Gram positivos, 96, 98
- Código bacteriológico, 89
  - de traducción, 40
  - genético, **40**, 41f, 91, 237
  - genético, degeneración, 496
- Codón, 40
  - con sentido, 497
  - de iniciación, 40
  - de paro, 40, 499
- Coenzima, 240, 241f, 242f
  - A, 131, 132, 241f
  - B_{12}, 241f, 312
  - M, 115, 241f, 354, 356f
  - tiaminadifosfato, 405
- Col fermentada, 309
- Cólera, 315
- Colicina, 534
- Colifago ΦX174, 146f
  - fd, 146f, 154f
  - lambda, 154f
  - RNA fr, 154f
  - T2, 154f
- Coliformes, 114, 315
- *Collybia*, 171
- Colmenillas, 187
- Colonias puntuales, 508f
- Coloración de Gram, 95
- Colorantes de acridina, 501
  - fenacínicos, 87
  - intercalantes, 501
- Columna de Winogradsky, 427f
- *Comamonas carboxydovorans*, 272
- Comensalismo, 596
- Cometabolismo, 486
- Competencia, 517
- Competitivo, mecanismo, 224
- Complejos bc1, 265, 267
  - proteicos de la cadena respiratoria, 270f
- Complementarias, reacciones, 238
- Comportamiento magnetotáctico, 72
- Composición química, 25
- Compost, 390
- Compuestos aromáticos, degradación anaerobia, 484
  - aromáticos, rotura meta del anillo, 484f
  - aromáticos, vías degradativas, 484f, 485f
  - ricos en energía, 245, 246
- Conalbúmina, 290
- Concatémeros, 542
- Condiliósporas, 170
- Coniferol, 469
- Conjugación, 512, **521**
  - interrumpida, 524
  - transferencia del DNA, 530f
  - transferencia direccional, 522
- Conservación, 231
  - de frutas, 228
  - procesos físicos, 231
- Conservantes, productos químicos, 233
- Conservativo, mecanismo, 31
- Constante alostérica, 567
- Constipado, 144
  - nasal, **167**
- Consumidores, 7
- Contaminación, 226
  - por petróleo, 484
- Conversión fágica, 158
- Cooxidación, 486
- Cordón de infección, 442
- Coreniformes bacterias, 25
- Corinebacterias, 62, 103, 478
- Corineformes bacterias, **96**, 101, 103
- Cornezuelo del centeno, 186, 187, 383
- Coronavíridos, 167
- Correpresor, 558
- Corrinoide, 333, 384
- Corteza terrestre, formación, 604
- *Corynebacterium*, 25, 85, 96, 100, 104
  - *diphtheriae*, 101, 102, 205
  - división celular, 101
  - *fascians*, 102
  - *glutamicum*, 13, 372, 372, 373f
  - *indiosum*, 87
  - *mediolaneum*, 102
  - *michiganense*, 102
  - *poinsettiae*, 102
- Cósmidos, 541
  - como vectores de clonación, 543f
- Coulter-counter, 209
- *Coxiella*, 98
  - *burnetti*, 131
- Crecimiento bacteriano en cultivo discontinuo, 213
  - balanceado, 209
  - bifásico, 214f
  - curva de, 213
  - exponencial, **211**, 212f, 217
  - factores, 194
  - fases, 214
  - fisiología, 208
  - inhibición, 222
  - logarítmico, 212
  - parámetros, 217
  - y concentración de sustrato, 220f
- *Crenothrix*, 97
- Cresoles, 223
- Creutzfeld-Jacob, enfermedad, 167
- *Cribraria rufa*, 175
- Criofilia, 199
- *Cristispira*, 97, 121
- Cromatiáceas, 134, 411f, **412**, 422, 424
  - características, 410f
  - distribución, 425
- Cromatios, 423
- Cromatóforos, 49, 413, 422, 432
- Cromosomas, 18
  - bacterianos, 4, 23, 26f
  - circulares bacterianos, replicación, 35f
  - homólogos, apareamiento, 19f

longitud, 29
número, **35**
Crossing over, 19
Crotonasa, 326
CRP, 561
Cryptococcus, 185
Cuajo, 310
Cuero, 13
Cuerpos basales, 68
de inclusión cristalinos, 78
Cultivo(s), aireación, 201
anaeróbicos, 202
axénicos, 582
continuo, **218**, 222
continuo en quimiostato, **218**, 219f
de enriquecimiento, 16, 204, 426, 427f, 453
discontinuo, 222
discontinuo, crecimiento bacteriano, 213
equilibrio dinámico, 220
medios, 193
medios complejos, 196
medios sintéticos, 196
mixto, 207
pH, 549
producción, 217
puro, 205
puro en medios líquidos, 207
puro natural, 208
recipientes, 202, 202f
selectivo, método, **204**
Curdián, utilización, 385f
Cylindrospermum, 136f, 140
Cystobacter, 97, 126f
Cytophaga, 30, 97, 126, 127f, 457, 468
fermentans agarovorans, colonias, 467f

D

Dador de electrones, 243
DAHP-sintasa, 572
Datura, 163
DBO, 593
Deinococcus, 93f
Deleción, 498
Demanda biológica de oxígeno, 593
química de oxígeno, 593
Densidad celular, 209
Depuración de aguas residuales, 486
Depuradoras, 351, 357, 592
biodigestores, 454
Dermatófitos patógenos, 304
Dermatophilus, 96, 106f
congolensis, 108
Dermatosis del ganado, 108
Dermocarpa, 98, 135, 136f, 140
Derxia, 96
gummosa, 446, 447f
Desaminación, 488
desaturativa, 489
hidrolítica, 489
oxidativa, 489
Desazoriboflavina, 115
Descarboxilación, 488
Descomponedores, 7
Desdiferenciación cancerígena, 162
Deshidrogenación, 243
Deshidrogenasas, 243, 245, 251, 256
Desinfección, 226
Desintoxicación del sulfuro de hidrógeno, 77
Desnitrificación, 9, **339**, 392
del nitrato, 395
y nitrógeno del suelo, 341
Desnitrificantes aeróbicas, bacterias, 339
bacterias, 274, 400
bacterias, cultivo de enriquecimiento, 340
Desove de ranas, bacterias de, 62
Desoxirribonucleico ácido, *véase* DNA
Desoxirribosa, **27**
Desplazamiento de tripletes, 498f
Despolimerasas, 61, 466, 596
Desrepresión, 561
constitutiva, mutación a, 578
Destoxificación microbiana, 486
Desulfobacter, 94f, 344
Desulfobacterium, 344
autotrophicum, 400
Desulfobulbus, 94f
Desulfococcus, 344
Desulfomonas acetoxidans, 350
acetoxidans y bacteria verde, cultivo mixto, 350f
Desulfonema, 344
Desulfosarcina, 94f
Desulfotomaculum, 11f, 79, 108, 344
acetoxidans, 344
nigrificans, 110
orientis, 110
ruminis, 110, 349, 459
Desulfovibrio, 11f, 94f, 97, 114, 119, 263, 344, 348-350
desulfuricans, 400
sulfodismutans, 344, 345
vulgaris, 347
Desulfuración, 10
Desulfurasas, 10
Desulfuricantes, 11f
aislamiento, 347
bacterias, 10, 274, 343, 447f
enriquecimiento, 347
Desulfurococcus, 97, 117
Desulfuromonas, 11f, 94f
acetoxidans, 400, 424
Detergentes, 223
Deuteromicetos, 181, **190**
Dextrano, 64, 465
utilización, 385f
Dextransacarasa, 62
Diacetilo, 320
bacterias formadoras, 320
Dialquil-diglicerín-diéter, 115
tetraéter, 115
Diámetro de los microorganismos, 14
Diauxia, 557
Diazadifenoquinonas, 87
Dicarion, 170
2,5-Dicetogluconato, 365
Diclorofenilmetilurea, 141
Dicotiledóneas, nódulos radicales, 445
Dictiosomas, 21
Dictyostelium discoideum, 172
mucoroides, 172
Diesterasa de veneno de serpiente, 27
Dietil pirocarbonato, 230f
Difosfatasa, 346
Difracción de rayos X, 28
Difusión de placa, test, 379f
facilitada, 284f, 285
pasiva, 285
simple, 284f
Dihidrolipoamida-deshidrogenasa, 255
Dihidrolipoamida-transacetilasa, 255

Dihidroxiacetona-fosfato, 248f, 297
Diimida, 441
Diluciones seriadas, test, 379
Dimensiones, 14
Dimetil-p-fenildiamina, 100
2,4-Dinitrofenol, 223, 299
Dioxigenasa, 475, 481, 482
Diplococos, 23, 25f
Directo en placa, método, 205
Discomicetos, 182, 183f, **187**
Disentería, 533
Disoluciones salinas, 438
Dispersivo, mecanismo, 31
Distribución, 15
División binaria, 208
  celular, 80, 222
  reduccional, 19
DNA, 2, 27, 493
  bacteriano, 25
  bacteriano, curva de fusión, 30f
  bicatenario, replicación, 34f
  clonado, expresión, 544
  del bacteriófago PM2, 28f
  del SV40, 149f
  descubrimiento, 517
  estructura, **27**, **29f**
  fágico, escisión, **161**
  fragmentación, **539**
  híbrido, 544
  híbrido, selección de clones, 544
  homología en las secuencias, 36
  inserción, 161
  mecanismo semiconservativo de replicación, 32
  modificación, 536
  molécula recombinante, construcción, 541
  pol III, 34f
  quimera, 541
  recombinación, 512
  recombinación y aspectos de seguridad, 546
  recombinante, aplicaciones, 545
  recombinante, técnica, 503
  reduplicación semiconservativa, 32f
  reparación, 509
  replicación, **30**, 31f
  restricción, 536
  secuenciación, 539, 540
  sondas, 14
  temperatura de alteración, 30
  transcripción, 39
  y tumores, 162
  y tumores animales, 163
DNA-DNA hibridación, 35
DNA-híbrido, 541
DNA-ligasa, 34f, 513
DNA-polimerasa, 33, 34f, 165
  función, 33f
  RNA-dependiente, 165f
DNA-quimera, obtención, 542f
DNAc, 541
DNasa pancreática, 27
Doble hélice plectonémica, modelo, 30f
DQO, 593
Dryas, 445
Duplicación, tiempo de, 584
Dyctiostelium discoideum, 175

E

EB, virus, 146f
ECHO, 146f
Ecología microbiana, 453, 582
*Eco*RI, 537
Ecosistema(s), 582
  acuáticos, **585**
  afóticos, 396
  diversidad de microorganismos, 584
  extremos, 584
  habitantes, 583
Ectosimbiosis, 594
Ectothiorhodospira, 98
  halochloris, 419
  halophila, 413
  mobilis, 48f, 49f, 413
Efecto Pasteur, 296, 297
Efector alostérico, 566
Elastasa, 488
Electrones, aceptor, 243, 274
  cadena abierta, 430
  dador, 243
  flujo cíclico, 430
  fosforilación en el transporte, 243, 346
  transporte, 45, 258, **337**
  transporte cíclico, 431
  transporte en bacterias anaeróbicas, 273
  transporte fotosintético, esquema en zig-zag, 434f
  transporte inverso, 272, 393
  transporte vectorial, 437
Electroporación, 518
Elementos IS, inserción, 515f
  limitantes del crecimiento de las planta, 11
Eliminación de microorganismos y lámpara de mercurio, 501f
Embden-Meyerhof-Parnas, vía de, 247
Encefalitis, 146f
Endo-ß-1,4-glucanasa, 455
Endoamilasa, 463
Endocitosis, 21
Endolisina, 155
Endomicetáceas, 183
Endomyces, 183
  lactis, 170, 300, 301
Endomycopsis, 183
Endonucleasa, 386, 518, 536, 539, 543, 541
  correctora, 509
  de restricción, 536, 537f
Endopeptidasa, 55, 487
Endosimbiosis, 594
Endosimbiótica, teoría, 21, 597
Endósporas, 82
  bacterias formadoras, 79
  reconocimiento, 79
  termorresistentes, 79
Endotoxinas, 59
Energía, cambio de, 235
  compuestos ricos en, 245, 246
  de activación, 239
  fuentes, 193, 203, 236
  libre, 264
  luminosa, transformación, 428
  luminosa y halobacterias, 438
  obtención, 235
  para la fijación de nitrógeno, 449
  transformación, 241
Enfermedad(es) de los porqueros, 122
  de Lyme, 122
  de Weil, 122
  infecciosas, 603f

Enlaces apolares, 37f, 38
  disulfuro, 38
  ß-glucosídicos, 73
  hidrófobos, 38
  iónicos, 37f
Enolasa, 250
Enriquecimiento, cultivo, 16, **204**, 426, 427f, 453
Ensilados, 309
Entamoeba histolytica, 276
Enteric cytophathic human orphan virus, 146f
Enterobacter, 97, 466
  aerogenes, 315, 316, 317f, 320
  aerogenes e histidina, 557
  aerogenes, fermentación, 319
  características, 314f
Enterobacteriáceas, 65, 74, 94, 195, 197, 215, 255, 302, **313**, 317, 339, 373
  lipopolisacáridos, 60
Enterobacterias, marinas, 320
Enterobactina, 289
Enterococcus, 304, 305f
  faecalis, 304
Enteroquelina, 290f
Enterotoxina, 231, 535
  del cólera, 315
Entner-Doudoroff, vía de, 111, 253f, 402, 424
Entrecruzamiento, 19
Enzima(s), 45, **386**
  alostéricos, 566, 577
  alostéricos, centro de simetría, 566f
  alostéricos, grado de actividad, 568f
  alostéricos, modelo secuencial, 566f
  alostéricos y efectores, 568
  biosintéticos, 551
  capacidad de inmovilización, 387
  coeficiente de cooperación, 566
  constitutivos, 549, 550
  curva de saturación hiperbólica, 565
  flavínicos, 110
  función, 239
  hiperbólicos, 565f
  inducibles, secuencia de aparición, 552
  isofuncionales, 571
  isofuncionales controlados, 570
  lesiones, 223
  málico, 276f, 278
  modelo de simetría, 567, 657
  modelo secuencial, 570, 657
  modelos de cooperatividad, 657
  modificación covalente de la actividad, 569
  producción microbiana, 387f
  regulación, 570
  regulación de la concentración, 558
  regulación de la síntesis, 549, 556f
  reguladores, 566
  sigmoidales, 565f
  síntesis coordinada, 553
  subunidades, 566
Eosina, 86
Epilimnion, 589
Epitelio, flora, 304
Epstein-Barr, virus, 146f
Equinenona, 137
Ergobasina, 187
Ergotamina, 187, 383
Ergotoxina, 187, 383
Eritromicina, 225, 382
Erwinia, 97, 315, 387f
  características, 314f
  carotovora, 118f, 466
Erysipelothrix, 96
Erysiphe, 186
Erythrobacter, 94f
Escherichia coli, 15f, **24f**, 26, 29, 35, 39, 54, 55, 67, 74f, 92, 97, 114 121, 131, 144, 202, 215, 266f, 315, 316, 317f, 394f
  autorradiograma, 27f
  biosíntesis, 156f
  características, 314f
  degradación de la glucosa, 254f
  duplicación, 34
  fagos, 152
  fermentación, 318
  inducción enzimática, 551
  mapa genético, 525f, 526
  mureína, 53f
  producción, 217
  y fago lambda, 159
  y penicilina, 56f
  y piruvato, 275
Escisión del DNA fágico, 161
  enzimática, 375
Esclerocios, 187
Esféricas bacterias, 23
Esferoidales bacterias, 96
Esferoidina, 421
Esferoplastos, 56
Espacio periplásmico, 52, 60
Especie, 90
Espino amarillo, 445
Espirilos, 24, 25f, **117**
Espiriloxantina, 421
Espiroquetas, 65, 93f, 97, 119
  cilindro protoplasmático, 120f
  de la sangre, 122
Esporangióforo de *Pilobolus*, 179f
Esporangios, 176
Esporangiósporas, 108, 170
Esporas aeróbicas, 108
  en germinación, 83f
  fúngicas, formación, 170
  germinación, 82
  maduras, características, 82
  termorresistencia, 79, 82
  tinción, 79
Esporobolomicetáceas, 190
Esporulación, 80f, **81**
  de bacterias aeróbicas, 81f
  endotrófica, 82
Esporulados aeróbicos, 110
Esqueleto de la pared celular, **52**
Esquizofíceas, 89
Esquizófitos, **89**, 135
Esquizomicetos, **89**, 135
Estado de mayor resistencia, 585
  HRF, 522
Estafilococos, 25f, 55, 375
Estaquiosa, 601f
Éster, 9
  fosfórico sencillo, 246f
Esterasa, 466
Esterilización, 227
  fraccionada, 228
  métodos, **226**
  parcial, 228
  por calor, 231
  por filtración, 231
Esteroides, 13
  síntesis microbiana, 373
  transformación biológica, 102

Estirpe, 90
Estreptobacterias, 305f
Estreptococos, 23, 25f, 114, 305f
Estreptomicetos, 384
  formas coloniales, 107f
Estreptomicina, 104, 105, 225, 381
  A, 381f
Estreptoquinasa, 488
Estrés por deficiencia de nutrientes, 585
Estromatolitos, **5**, 607, 608
Estructura cuaternaria, 38
  secundaria, 37, 38
  terciaria, 38
Etano, oxidantes, 477
Etanol, 179, 223, 243, 318f, 319, 327
  degradación, 477
  fermentación, 328, 329f
  formación, 301
  oxidación, 424
  procedencia del carbono, 301f
  producción, 12
  y levaduras, 295
Éter láctico, 56
Etilmetanosulfonato, 501
  acción mutagénica, 499f
Eubacterias, 5, **92**, 93f, 95
  árbol filogenético, 93f
  Gram negativas, 344
  Gram positivas formadoras de esporas, 344
  móviles, 65
Eubacterium, 96
  limosum, 326t
Eucariotas, 2, **92**, 93f
  células, 17
  evolución, 610
Eucariótica, célula, 611
Eucitos, 17
Eumicetos, 172, 181
  hifas, 169f
Eutrofización, 593
  de las aguas, 10
Evolución biológica, 607
  de los microorganismos, 5, 581, **606**
  química, 606
Exocitosis, 21
Exoenzimas, 386
Exo-ß-1,4-glucanasa, 455
Exonucleasa, 34
Exopeptidasa, 487
Exopolisacáridos, 64, 385
  de producción microbiana, 385f
  degradación, 465
Exósporas, 84
Exosporio, 81
Expansión, 15
Explosión, tamaño, 157f
Exponencial, crecimiento, 217
  fase, 215

F

F_{420}, 115, 356f
  función, 241f
F_{430}, 115, 355, 356f
  función, 241f
Factor de crecimiento, 194
  de integración del hospedador, 514f
  de transcripción sigma, 559
  F, 69, 522
  F región *tra*, 531
  F y transferencia, 524f, 527
  tetrapirrólico del níquel, 115
FAD, 260
  función, 241f
Fágica, conversión, 158
Fago(s), *véase* Bacteriófago(s)
  adsorción, 155
  atemperado, ciclo vital, 159f
  atenuados, desarrollo, 156
  atenuados y células kappa, 598
  desarrollo intracelular, 155
  lambda, 159f, 161, 513, 514f
  lambda, desintegración, 159
  lambda, inserción, 160f
  lambda, integración, 159, 160f
  lambda, integrasa, 161
  liberación, 156
  libres, 158f
  M13, 542
  Mu, 503, 515
  P22 de *Salmonella*, 153f, 520
  PBS1 de *Bacillus subtilis*, 520
  Phi, 521
  resistencia a los, 155
  T2, 152f, 155, 157f
  transductor inespecífico P1 de *Escherichia coli*, 520
  virulentos, 156
Fagocitosis, 21
Familia, 90
Fantasmas, 55
FBP, vía, 247
FCCP, 268, 287
Fenacina, 87
Fenacina-1-carbónico, 87
Fenacínicos, colorantes, 87
Fenilacetilcarbinol, síntesis, 374
Fenilalanina, síntesis, 282f
Fenol(es), 223
  degradación, 485
Fenoloxidasa, 472
Fenotípica, adaptación, 494
Fenotipo, 494
Fermentación(es), 4, 292
  acética, 331
  ácida mixta, 313, 321
  alcohólica por levaduras, 295
  butirato-butanol, 323
  butirato-butanol y clostridios, 323
  butírica, 331
  de *Bifidobacterium*, 307
  de la glucosa, 331f
  de la glucosa, productos, 318f
  de Neuberg, 296
  de Neuberg, segunda forma, 297
  de Neuberg, tercera forma, 297
  de parejas de aminoácidos, 330
  del acetato, 328, 329f
  del ácido glutámico, 329
  del etanol, 328, 329f
  del glutamato, 330f
  del lactato, 329
  especiales, 326f
  fórmica, 255, **313**
  homoacética, 332
  láctica, 302
  láctica heterofermentativa, 306, 307f
  láctica homofermentativa, 304
  oxidativa, 363
  propiónica, 310
  sin sulfato, 347
  tubos de, 316
  y ATP, 274, 292

  y energía para la fijación de nitrógeno, 449
Fermentador sin difusor, 201
Fermentadoras, bacterias, 291
Fermentadores de biogás, 357
  obligados, 447f
  papel, 295
Feromona sexual, 531
Ferredoxina, 294, 435, 436, 438, 449
  H_2-oxidorreductasa, 294
Ferredoxina-NADP-reductasa, 436
Ferricromos, 289
Fibrobacter, 97
Fíbula, 189
Ficobiliproteínas, 140, 419, 433
Ficobionte, 595
Ficocianina, 137
Ficocianobilina, 137
Ficoeritrina, 137, 426
Ficoeritrobilina, 137
Ficomicetos, 172, **176**
Fiebre amarilla, 146f
  de las Montañas Rocosas Americanas, 130
  Q, 131
  recurrentes, 122
Figuras de respiración de Beijerinck, 72f
Fijadoras de nitrógeno, bacterias, 9
Filamento, bacterias formadoras, 123f
  flagelar helicoidal, 68
Filogenético árbol, 3f, 93f
Filogenia bacteriana, 91
Filtración, 229
Filtros de membrana de nitrocelulosa, 229
Fimbrias, 69
Fischerella, 98, 136f
Fitanilo, 115
Flagelación bipolar politrica, 66f
  lateral, 68f
  monopolar monotrica, 66f
  monopolar politrica, 66f
  peritrica, 65, 66f, 68f, 71, 363
  polar, 363
  polar monotrica, 67f
  polar politrica, 67f
  tipos, 66f-68f
Flagelina, 68
Flagelos, 22, **65**
  bacterianos, anclaje, 70f
  disposición, 65
  función, 65
  inserción, 65
  ultraestructura, 67
  velocidad de rotación, 66
  visualización, 65
Flavinas, 86
Flavobacterium, 93f, 468
Flavoproteínas, 260, 265
Flavotoxina, 449
Fleixantofila, 85f
Flexibacter, 97, 127f
  columnaris, 128
Flexibilidad metabólica, 15
Flip-flop, mecanismo, 516
Flor de agua, 137
Flora autóctona del suelo, 102
  de la piel humana, 599
  gastrointestinal humana, 599, 600f
Fluoracetato, 223
FMN, 260
  función, 241f
$FMNH_2$, 322
  oxidación, 322
Fobotaxis, 72
Folato, 241f
Formadoras de endósporas, bacterias, 79
Formaldehído, ciclo de la xilulosamonofosfato de fijación, 476
Formas bacterias unicelulares, 25f
  de persistencia, 79
  L estables, 134
  L lábiles, 134
Formiato, 318
Formiato-deshidrogenasa, 318, 333
Fosas marinas afóticas, producción, 586
Fosfatidiletanolamina, 283
Fosfatidilglicerina, 283
Fosfatidilinositol, 283
Fosfato de nicotinamid-adenindinucleótido, 243
  véase también NADP
  de piridoxal, 241f, 491
Fosfato-2-ceto-3-desoxi-6-fosfogluconato, 245
Fosfato-deshidrogenasa, 402, 403, 574
Fosfocetolasa, 293, 302, 306-308
Fosfocreatina, 246f
Fosfoenolpiruvato, 246f, 248f, 276f, 286
Fosfoenolpiruvato-carboxilasa, 275, 276f
Fosfoenolpiruvato carboxiquinasa, 275, 276f, 278
Fosfoenolpiruvato carboxitransfosforilasa, 276f
Fosfoenolpiruvato-sintasa, 275, 276f
Fosfofructoquinasa, 299, 403, 572
  propiedades alostéricas, 574
  y adenilatos, 574
  y citrato, 574
6-Fosfofructoquinasa, 248, 250, 275
3-Fosfoglicerato, 249f, 250
  reducción, 272
Fosfoglicerato-quinasa, 247, 250, 293, 404
Fosfogliceromutasa, 250
6-Fosfogluconato, 251
Fosfogluconato-deshidrasa, 252
Fosfogluconato-deshidrogenasa, 251
6-Fosfogluconolactona, 251
Fosforilación a nivel de cadena respiratoria, 260, 268
  a nivel de sustrato, 237f, 250
  en el transporte de electrones, 243, 346
  oxidativa, 45, 237f, 238, 247
  y transporte de electrones, **259**
Fosforilasa, 462, 569
Fósforo, 11
  ciclo, 9
  en el agua marina, 12f
Fosforolisis, 462
Fosforribulosa-quinasa, 403, 406
Fosfotransacetilasa, 319, 326, 333
Fosfotransferasa, 288
Fotooxidación, **86**, 422
Fotoquímica, reacción redox, 430
Fotoquímico de reacción, centro, 429

Fotorreacción, 429
  en las bacterias rojas, 431
Fotorreactivación, 502, 509
Fotosensibilizadores, 86
Fotosíntesis, 261, 284, **428**
  anoxigénica, 409, 428, **429**
  con fijación de anhídrido carbónico, 235
  ecuación general, 428
  evolución, 433
  oxigénica, 409, 428, **433**
  productos, 428
  reacción oscura, 428
  y energía para la fijación de nitrógeno, 449
Fotosintético, aparato, 137
Fotosistema I, 434, 436f, 609
  II, 434, 436f, 609
Fototaxis, 72
Fototrofas aeróbicas, bacterias, 203
  anoxigénicas, bacterias, 10, 98, 134, 203
  bacterias, 98, **409**, 428, 430
  bacterias, distribución, 425
  bacterias, espectros de absorción, 420f
  bacterias, fijación de CO_2, 423
  oxigénicas, bacterias, 98
Fototrofos, organismos, 203
  organismos, condiciones de enriquecimiento, 206f
Fragmentos de Okazaki, 33
  de restricción, patrón, 539
Frambuesa tropical, 122
Frankia, 96, 445
Fresas, pasteurización, 229
Fructanos, degradación, 465
Fructosa, 243
  y *Alcaligenes eutrophus*, 402
Fructosa-bifosfato, vía, 237f, 311, 324, 424
Fructosa-1,6-bifosfato, 247, 248f
  vía, **248**, 249f, 254f
Fructosa-bifosfato-aldolasa, 248, 405
Fructosa-6-fosfato, 248f, 293
Fruta, conservación, 228
Fuentes termales, 116, 397
  termales ácidas, 395
Fuligo septica, 175
Fumarasa, 257f, 258
Fumarato, reducción, 358
  respiración, 319, 338f, 359
Fumarato-deshidrogenasa, 359f
Fumarato-hidratasa, 258
Fumarato-reductasa, 274, 319, 360
  ligada a membranas, 359f
Fumarolas, 587
Fungi, 172
Fusarium, 171f
Fusobacterium, 97, 114
  nucleatum, 326t
  symbiosus, 276

G

Galactoquinasa, 303
Galactosa, 104
D-Galactosa, 461f
α-Galactosidasa, 303, 316, 551, 561
  inducción de la formación, 552f
α-Galactósidos, 601f
Gallionella, 98, 128f, 199
  ferruginea, 64, 130, 398
Gametangiogamia, 171
Gametangios, 171
Gametos haploides, 19
  transferencia, 171
Gancho del flagelo, 68
Gangrena gaseosa, 332
Gas de los pantanos, 351
  detonante, bacterias del, 400
  detonante, reacción bioquímica, 235
  natural, 13, 453
  vacuolas, 78, 139
Gasteromicetos, 190
Gelatina, 196
Gemación de los hongos, 170
Gemantes, bacterias, 98
Gen(es), **40**, 493
  cromosómicos, transferencia, 524
  de la ß-galactamasa, 544
  de la ß-galactosidasa, 544
  killer de *Paramecium aurelia*, 597
  nif, 141
  nif, transferencia, 451
  oncogénicos de los retrovirus, 166
  recombinación, 20
  regulador, 559
  RNA polimerasa-holoenzima, 559
  saltadores, 515
  tra, 530
  trp, 521
  vírico *src*, 166
Generación, tiempo de, 208, **211**, 584
Género, 90
Genética, información, **493**
Genético, código, 41f
Genoma, 19
Genómico, tamaño, 35
Genoteca, 541
Genotípica, modificación, 494
Genotipo, 494
Geosmina, 105
Geotrichum candidum, 183
Germinación de las esporas, 82
Gliceraldehído-3-fosfato, 248, 249f, 252, 304
Gliceraldehído-3-fosfato-deshidrogenasa, 404
D-Glicerato, vía del, 278
Glicerato-1,3-bifosfato, 250
Glicerato-quinasa, 278f
Glicerín-fosfato-deshidrogenasa, 248
Glicerina, 12, 243, 297
3-Glicerofosfato, 248f
Glicina, síntesis, 282f
Glicolato-oxidasa, 278f
Glioxilato como sustrato, 278
Glioxilato-carboligasa, 278, 558
Glioxilato-carboxilasa, 558
Gloeobacter, 98, 136f
  violaceus, 135, 138
Gloeocapsa, 98, 135, 136f
Gloeothece, 98, 135, 136f
Glosopeda, 144, 146f, 545
Glucanasa, 465
Glucanos, degradación, 462
Glucoamilasa, 386
Glucógeno, **73**, 74
  gránulos, 138
  inclusiones, 74f
  síntesis, 576
Glucógeno-sintetasa, 569, 576
Glucólisis, 214, 237, **248**, 249f
Gluconato, 111
Gluconato-deshidratasa, 245
Gluconeogénesis, 274, 574
Gluconobacter, 96
  melanogenum, 365
  oxydans, 364, 387f

oxydans, degradación de la glucosa, 254f
Gluconolactonasa, 251, 367
β-D-Glucopiranosa, 455
Glucosa, 9, 194, 243
  balance energético de la respiración, **268**
  como sustrato, 275
  degradación, 249f
  degradación oxidativa, 253f
  efecto, 556f, 561
  fermentación, 331f
  fermentación por levadura, 296
  productos de la fermentación por *Enterobacter aerogenes*, 318f
  productos de la fermentación por *Escherichia coli*, 318f
  síntesis, 574
  transporte, 288f
Glucosa-deshidrogenasa, 365
Glucosa-6-fosfato, 248f, 251
  degradación oxidativa, 252f
Glucosa-6-fosfato-deshidrogenasa, 251, 308, 402, 403
Glucosa-fosfato-isomerasa, 248
Glucosa-isomerasa, 386
Glucosa-oxidasa, 273, 367, 387f, 472
β-Glucosidasa, 455
Glucósidos, 246f
Glutamato, fermentación, 330f
  síntesis, 282f
Glutamato-deshidrogenasa, 489
L-Glutamato-deshidrogenasa, 280
Glutamato-sintasa, 280, 450f
Glutamina, 140
  síntesis, 282f
Glutamina-sintetasa, 280, 444, 450f, 569
Gonorrea, 99
Gradiente de densidad de ClCs, 32
Grafito, oxidación, 483
Gram, coloración, 50, 95
  negativas anaeróbicas, bacterias, 97
  negativas, bacterias, 59, 70f, **96**
  negativas, bacterias, capas externas, 57
  negativas, bacterias, pared celular, 54, 58f
  negativas curvadas, bacterias, 97
  negativas de flagelación polar, bacterias, 394
  negativas deslizantes, bacterias, **97**, 344
  negativas espiraladas, bacterias, 97
  negativos, bacilos, 113, 363
  positivas, bacterias, 93f, 96
  positivas, bacterias, pared celular, 53
Gramicidina S, 382
Gránulos de cianoficina, 78
  sudanófilos, 74
Granulosa, 74
Grasas de reserva, síntesis, 575
  neutras, 75
  síntesis, 283
Gripe, 144, 146f
  virus, 148, 149f, 167
Grupo, traslocación, 288
Guanina, 27, 28, 30, 39, 40
Guisante, nódulos radicales, 443f, 444f
Gunnera, 137
  macrophylla, 446

H

H_2-citocromo-c_3-óxido-reductasa, 346
H_2-NAD-óxido-reductasa, 401
Hábitat ecológico, 582
*Hae*III, 537
Haemophilus, 90
Halobacterias, 78, 115, **116**
  y energía luminosa, 438
Halobacterium, 97, 116
  halobium, 78
  halobium, bomba de protones, 438f
Halococcus, 97, 116
Haloferax, 97, 116
Halófitas, bacterias, 586
Haloruberina, 116
Halos líticos, 144f
Hansenula holstii, 466
Harden-Young, ecuación de fermentación, **299**
Helicobacter, 97
Helicoidal desnudo, virus, 146f
  envuelto, virus, 146f
Heliobacillus, 418
Heliobacterias, 418
Heliobacterium, 418
Heliospirillum, 418
Helmintos aeróbicos facultativos, 360
Helvelas, 187
Helvella, 187
Hemicelulosa, 9, 461
Heminas, 302
Hemo, derivados, 241f
Hemolisina, 488, 535
Herbicida DCMU, 141
Herencia, 493
Herpes, 545
  simplex, 146f
  zóster, 151
Herpetosiphon, 97
Heterobasidiomicetos, 190
Heterocariosis, 190, 191
Heterocistos, **139**, 141, 446, 449
  y nitrógeno, 140
Heterodúplex, molécula, **35**
Heterótrofos, organismos, 203
Hexones, 148
Hexoquinasa, 248f, 250
Hexosa-isomerasa, utilización, 387f
Hexosamonofosfato, 247
Hexosas, 238
  degradación, 237f, 247, 573, 574
Hexosiltransferasa, 62
Hexulosa-fosfato-isomerasa, 477f
Hexulosa-fosfato-sintasa, 477f
Hibridación, 35
  DNA-DNA, 35
Hibridomas, técnica, 545
Hidracina, 441
  del ácido isonicotínico, 104
Hidrocarburos alifáticos de cadena larga, degradación, 478
  aromáticos, degradación, 479
  aromáticos, degradación anaerobia, 484

  degradación, 474
  mecanismo de oxidación, 479
Hidrocortisona, 374
Hidrogenación, 243
Hidrogenasa, 318, 346, 399, 445, 448, 449
  función protectora, 445, 449
Hidrógeno, 318f
  bacterias aeróbicas oxidadoras, 400, 401
  dadores, **203**, 243, 427f
  dadores inorgánicos, 389
  fijación, 423
  fotoproducción, 425
  molecular, 327
  molecular, oxidación, 399
  puentes, **29**, 30, 37f
  receptor, 243
  súlfito, 297
  sulfuro, 396
  y anhídrido carbónico, 332
  y metabolismo energético, 401
Hidrógeno-liasa, 294
  fórmica, 318
Hidroxamato, grupo, 289
3-Hidroxiácidos, 104
Hidroxiácidos de cadena larga, 75
1,2-Hidroxibenceno, 481
4-Hidroxibenzoato, 241f
ß-Hidroxibutil-CoA-deshidrogenasa, 326
2-Hidroxiisovalerato, 382
Hidroxilamina, 501
  acción mutagénica, 499f
Hidroxilamino-óxido-reductasa, 391
4-Hidroximercuriobenzoato, 223
5-Hidroximetil-citosina, 153, 155
3-Hidroxi-3-metilglutaril-CoA, 491
Hidroxipiruvato-reductasa, 476
Hierro, 10
  bacterias del, 199, 398, 604
  corrosión anaeróbica, 348
  depósitos, 604
  en el agua marina, 12f
  reducción, 337
  reducción de iones, 360
  respiración, 338f
  transporte, 289, 290f
Hifas, 169
Hill, coeficiente, 566
Himenio, 189
Himenomicetos, 190
  ciclo biológico, 189
Hinchamiento, reacción, 62
Hipertermofilia, 199
Hipoclorito cálcico, 231
Hipolimnion, 78, 589
Hipótesis un gen - un enzima, 493
Histidasa, 557f
Histidina, degradación, 563
  síntesis, 282f
Histonas, 2, 20
Hombre, flora cutánea, 599
  flora gastrointestinal, 599, 600f
  virus patógenos, 167
Homobasidiomicetos, 190
Homocisteína, 10
Homología secuencias del DNA, 36
L-Homoserina, 373
Homoserina-deshidrogenasa, 571
Hongos, 13, **169**
  celulolíticos, 456f
  clasificación, 171, 173f
  con ascas, 181
  con sombrerillo, 190
  cuerpo vegetativo, 169
  de las aguas residuales, 112, 592
  de las fresas, 229
  de las hostias, 87, 315
  degradadores de la lignina, 471
  del suelo, 596
  erectos, 188
  estrellado, 105
  forma imperfecta, 181
  forma perfecta, 181
  forma secundaria, 181
  heterotálicos, 171
  homotálicos, 171
  imperfectos, 190
  incompatibilidad, 171
  inferiores, 172, **176**
  inferiores y síntesis de esteroides, 374
  metabolismo, 366
  mucosos celulares, 172
  mucosos verdaderos, 172, **175**
  multiplicación, 170
  parasexualidad, 190
  pigmentos, 84
  ramificados, 190
  reproducción asexual, 171f
  reproducción sexual, 170
  superiores, 172, 181
  y α-amilasas, 463
  yesqueros, 190
Hormogonios, 140
Hormonas, síntesis, 13
HS-HTP, 354, 356f
HTP, 241f
Humificación, 473f
Humus crudo, 474
  formación, 472
Hungate, técnica, 352
Huso acromático, 19
Hyphomicrobium, 98, 128f, 476
  vulgare, 129
Hyphomonas, 98

I

Icosaédrico desnudo, virus, 146f
  envuelto virus, 146f
  virus, 150f
Identificación de bacterias, 94, **95**
Idiofase, 216
Indigoidina, 85f, **87**
Indol, formación, 316, 317
Inducción, **158**, 560f
  de la ß-galactosidasa, 551
  de mutaciones, 500
  enzimática, 550, 551
  enzimática coordinada, 552
  por producto, 553
Inductor, 558
Infalibilidad microbiana, principio, 453
Infección, 226
Ingeniería genética, regulación, 547
INH, 104
Inhibición alostérica, 566
  competitiva, 223
  halos, 376
  por producto final, 550
Inmovilización, procesos, 365
Inmunidad y profago, 158
Inmunodeficiencia humana, virus de la, 167
Inocybe patouillardii, 383
Inorgoxidación, 389
Inserción, 498, 514
  secuencias, 514

Integrasa, 513
  del fago lambda, 161
Intercalación, 501
Intercambios de bacterias, 14
Intermareal, zona, 351
Intestino, bacterias relacionadas, 304
  transformaciones microbianas, 601f
Intoxicación por productos alimentarios, 231, 315
Intracitoplasmática, membrana, 23, **46**
Invasinas, 535
Inversión génica, 516
Invertasa, utilización, 387f
Investigación genética, 16
Iodinina, 85f
Iones hidrógeno, concentración, 196
  inorgánicos y bacterias, 389
  y membrana citoplasmática, 287f
Ionóforos, 286, 287, 382
Irradiación, 230
Isoamilasa, 463
Isocitrato-deshidrogenasa, 256, 257f
Isocitrato-liasa, 257f, 277, 278, 371, 476, 558
Izoenzima, 570
Isogametos, 171
Isoleucina, degradación, 313
  síntesis, 282f
L-Isoleucina, 373
Isomerasa, 476
Isopropanol, 243
Isorenieratina, 422

J

Judía, nódulos, 444f

K

KDGP, vía, 237f
KDO, 60
KDPG, vía, 247
Kéfir, 310
Kinurenina, 554
Klebsiella, 97, 385f
  características, 314f
  pneumoniae, 315, 446, 447f
  pneumoniae, producción, 217
Kloeckera, 301
Krebs-Kornberg, ciclo de, 277
Kumiss, 310

L

Lactato, 275, 318f, 319
  fermentación, 329
  y panza de los rumiantes, 459
Lactato-deshidrogenasa, 243, 244
Lácteos, productos, 12, 309
Lácticas, bacterias, 601f
  bacterias, crecimiento, 302
  bacterias, requerimientos nutritivos, 302
  bacterias y porfirinas, 303
  heterofermentativas, bacterias, 302
Lactobacillus, 96, 100, 303, 304, 305f
  acidophilus, 310
  brevis, 307f
  bulgaricus, 310
  casei, 307, 310
  coryniformis, 310
  delbrueckii, 310
  delbrueckii bulgaricus, 309
  delbrueckii lactis, 309
  helveticus, 309
  leichmannii, 310
  plantarum, 307, 309, 310
Lactobacilos, 114, 197, *véase también* Ácido láctico, bacterias
Lactobacteriáceas, 302
  hábitats, 303
  heterofermentativas, 304, 305f
  homofermentativas, 304, 305f
  morfología, 305f
  tipo fermentativo, 305f
Lactococcus, 100, 303, 305f
  diacetilactis, 309
  lactis cremoris, 309
  lactis lactis, 309
Lactosa, 316
  absorción intestinal, 602f
Lactotransferasa, 290
Lagos, 426f, **588**
  amícticos, 590
  biomasa, 591f
  concentraciones, 591f
  estratificados, 591
  eutróficos, sección vertical, 588f
  holomícticos, 589, 590
  meromícticos, 590
  salados, 438
  transformación, tasas, 591f
Lamarck, teoría, 494
Lamelas, 46
  fotosintéticas, 49f
Lamprocystis, 78, 94f, 98
  roseopersicina, 411f, 413
Lampropedia, 96
  hyalina, 64
Latencia, fases, 214
  período de, 155, 157f
  tiempo de, 217
Laurilsulfato, 26
Leche ácida, 309
  especies relacionadas, 303
  esterilización, 228
  UHT, 228
Lectinas, 442
Leghemoglobina, 444, 449
Legionella, 96
Leguminosas, 399, 441
  nódulos radicales, **442**, 443f, **445**
  simbiosis, 442
  y rizobios, 21
Lejías sulfíticas, 300, 388
Lepra, 104
Leptomitus, 176
  lacteus, 169f
Leptospira allidum, 121
  biflexa, 122
  canicola, 122
  icterohaemorrhagiae, 122
  pomona, 122
Leptothrix, 97
  discophorus, 398
  ochracea, 63, 113, 398
Leptotrichia, 97, 114
  buccalis, 114
Leucemia, 146f
Leucina síntesis, 282f
  vía degradativa, 490f
Leuconostoc, 96, 98, 100, 303, 305f, 310
  cremoris, 309
  dextranicum, 465
  mesenteroides, 62, 196, 263, 302, 306, 307f, 385f, 465
Leucothrix, 94f, 98, 124f
Levadura(s), 12, 75, 183, 184f, 195, **295**, 310, 601f
  altas, 300

  aplicaciones, 300
  asporógenas, 185
  bajas, 300
  ciclo biológico, 184f
  consumo de glucosa, 298f
  de cervecería, 300
  de fondo, 300
  de panadería, 15f, 300, 573
  estructura, 184f
  multiplicación, 185f
  para piensos, 388
  represión de la fermentación, 549
  reproducción asexual, 170
  superficiales, 300
  y metanol, 476
  y oxígeno, 297
Levanos, 63, 64
  formación, 465
Levanosucrasa, 466
Licopina, 421
Ligasa, 33
Lignanos, 9
Lignina, 9, **469**, 470f
  biosíntesis, 471f
  degradación, 470
Lignina-peroxidasa, 471
Ligninasa, 471
Lignocelulosa, 454, 486
Limoneros, amarilleamiento, 134
Limos, 61, 62
Linfocitos B, 168
  T4, 168
Linfogranuloma venéreo, 131
Lino, enriado, 467
Lipasa, 386, 465
  utilización, 387f
Lipídicas, sustancias, 74
Liponato, 241f
Lipopolisacáridos, 59
  como endotoxinas, 60
Lipoproteínas, 58
Líquen estructura, 595f
Lisina, 52, 54
  síntesis, 282f
Lisogenia, 156
Lisogénicas, bacterias, 157, 158f
Lisozima, 26, 44, 50, 53f, 54, 130, 139, 140
  acción, 54
  fágica, 155
  y protoplasto, 55f
  y vesícula, 55f
Listeria, 96
  monocytogenes, 100
Litorales marinos, 586
Litotrofos organismos, 203
Lixiviación de minerales, 397
  microbiana, 604
Locomoción, orgánulos, **22**
Lodos, 347
Lofotricos, 65
Lophoderma, 187
Luciferasa, 163, 321, 322
Luminiscencia, 320, 321
  autoinducción, 322
  bacteriana, 322
  en animales, 322
Luminiscentes, bacterias, 199, 320, 321, 599
Lupino, nódulos, 444f
Lycogala epidendron, 175
Lyme, enfermedad de, 122
Lyngbya, 98, 136f

M

M13, 146f
Macrólidos, 382
Madera, 9
  podredumbre blanca, 471
  podredumbre parda, 470
Madre del vinagre, 365
Maduración final, 156
Magnetosomas, 72
Magnetotaxis, 72
Malaria, 545
Malato, 276f
Malato-deshidrogenasa, 243, 257f, 258
Malato-sintasa, 257f, 278, 279, 371, 558
Malato-tioquinasa, 476
Malil-CoA-liasa, 476
Malonato, 223, 224f, 225
Malonil-CoA, 283
Maltasa, 463
Manano, degradación, 466
Manasa, 465
Manganeso, 435
D-Manosa, 461f
Mantequilla de la nata ácida, 309
  suero de, 309
Mapa genético, 526
Mar, biomasa, 586
  fuentes hidrotermales, 587f
  productividad, 585
  productividad de los fondos, 586
  productores primarios, 585
Marinas, bacterias, 199
  oxidadoras del nitrito, bacterias, 47
Masa ácida, 310
  bacteriana, determinación, 209, 210
  intercambio, 235
Materia, ciclo, 7
  orgánica, mineralización, 7
Materiales de reserva, 73
Maxam y Gilbert, método, 539
Mecanismo semiconservativo de replicación del DNA, 32
Medio(s) de cultivo, 193, **196**
  de cultivo claros, 16
  de cultivo complejos, 196
  de cultivo, flujo, 219
  de cultivo sintético, 196
  de cultivo sólidos, 196
  de cultivo, tasa de dilución, 219
  de cultivo, tasa de lavado, 219
Megacina, 534
Megaplásmidos, 535
Megasphaera, 96
  elsdenii, 100
Meiosis, 19, 19f
  de los hongos, 170
Melittangium, 97, 126f
Membrana citoplasmática, 44
  citoplasmática, modelo, 45f
  citoplasmática y transporte de iones, 287f
  citoplasmática y transporte de nutrientes, 284
  externa, 58
  externa, función, 60
  intracitoplasmática, 23, **46**
  nuclear, 18
  purpúrea, 439
  unitaria, 44
  vesiculares, polaridad, 433
  y respiración, 260
Meningitis, 100
Mercaptano, 10
Mercurio, lámpara, 501f
Mesófilas, bacterias, 199
Metabólicas específicas, vías, 236
Metabolismo, 235
  básico, 223
  en la oscuridad, 424
  excesivo, 366
  intermediario, 236
  regulación, 549

  sintético, 236
  vías, 236
Metabolitos, 243
  secreción, 288
  secundarios, 88
  secundarios, pigmentación, 88
  transportadores, 245
Metacromasia, 76
Metafase, 18f
Metahemoglobina, formación, 343
Metales pesados, 223
Metalimnion, 589, 591
Metallogenium, 98
Metano, 7
  degradación, 475
  en el hombre, 602f
  en la panza, 459
  oxidación, 476
Metano-oxigenasa, 476
Metanofurano, 241f, 356f
Metanogénesis, 351
  ganancia energética, 354
Metanogénicas, bacterias, 115, **116**, 274, 291, 400, 598
  bacterias, coenzimas, 356f
  bacterias, fisiología, 352
  bacterias, grupos prostéticos, 356f
Metanógenos, 446, 447f
Metanol, utilización, 476
  y levadura, 476
Metanol-deshidrogenasa, 477
Metanopterina, 115, 241f, 356f
Methanobacterium, 92, 95, 97, 351
  formicicum, 116
  omelianskii, 328, 353
  thermoautotrophicum, 116, 356, 358, 400
Methanobrevibacter arboriphilicus, 116
  ruminantium, 116
Methanococcus, 97, 351
  vannielii, 116
Methanoplanus limicola, 116
Methanosarcina, 97
  barkeri, 116, 351, 355
Methanospirillum, 351
  hungatei, 116
Methanothermus, 97
  fervidus, 116
Methanothrix, 97
  soehngenii, 116
Methylococcus, 475
  capsulatus, 199
Methylocystis, 84
Methylomonas, 111, 475
  methanica, 477
Methylosinus, 475
  trichosporium, 84
Metil-coenzima, 355
  M-metil-reductasa, 355, 356f
N-Metil-L-2-glucosamina, 381
Metil-malonil-CoA, vía del, 312f, 360
Metil-malonil-CoA-carboxitransferasa, 312, 313
Metil-malonil-CoA-mutasa, 313
M-Metil-reductasa, metil-coenzima, 355, 356f
Metil-transferasa, 536
Metionina, 10
  síntesis, 282f
Métodos físicos, 17
  químicos, 17
Micelio, 169
  aéreo, 105
  basal, 105
  gemular, 179
  secundario dicariótico, 189
Micetoma, 599
Micobacterias, **103**, 106f, 478
Micobactina, 289
Micólicos, ácidos, 104
Micoplasmas, 98
Micorrizas, 596
Micotoxinas, 383
Micro-Kjeldahl, método, 210
Microaerófilas, bacterias, 71f, 72, 195
Microaerotolerantes, 98
Microbacterias, 75, 86
Microbiología industrial, 363
Microbionte, 595
Microbispora, 96, 106f
Micrococcus, 30, 85, 96, 99
  luteus, 44f, 54, 74, 85f
  lysodeikticus, 54, 99
Micrococos, 15, 22, 25f
Microcoleus vaginatus, 138f
Microcyclus, 97
Microcystis aeruginosa, 78
Microflora autóctona, 474
Micrómetro, 14
Micromonospora, 96, 106f, 468
Microorganismos, 2
  alóctonos, 583, 584
  autóctonos, 583
  beneficiosos, 12
  crecimiento, 193
  destrucción, 226
  evolución, 5
  muerte, 226
  nutrición, 193
  patógenos, 12
  perjudiciales, 12
  reino, 4f
  taxonomía, 1
  zimógenos, 584
Microscopia de campo oscuro, 17
  electrónica, 17
  óptica, 17
  ultravioleta, 17
Mildiu de la vid, 177
  verdadero, 186
Miller, experiencias, 607
Minerales, lixiviación, **397**
Mineralización, **7**, 235
  anaeróbica, 454
Miosina B, 176
Mirto de Bravante, 445
Mitocondrias, 20, **21**
  de eucariotas y cadena respiratoria, 266f
Mitomicina, 158
  C, 225, 509
Mitosis, 18f
Mixamebas, 175
Mixobacterias, 65, **124**, 125, 172, 175, 457
Mixoflagelados, 175
Mixomicetos, 172
  ciclo, 174f, 175
Mixósporas, 84
Mixotrofa, nutrición, 402
Mixotrópicos, virus, 145
Mixoxantofilia, 137
Mixozigoto, 175
MKS, 146f
Modelo de doble hélice plectonémica, 30f
  de Watson y Crick, 28
Moho blanco del estiércol, 178
  del agua, 176
  del pan, 178
Moléculas C, 275
  efectoras, 558
  heterodúplex, 35
Molibdeno, 449
  y fijación de nitrógeno, 448
Mollicutes, 98, 132

Moluscos, 122
Monilinia fruticola, 187
Monimolimnion, 590
Mono-oxigenasa, 392
Monocotiledóneas, tecnología genética, 163
Monómeros, síntesis, 237f
Monomorfismo, 494
Mononucleosis infecciosa, virus, 146f
Monooxigenasa, 322, 475, 479, 481, 486
  y degradación de alcanos, 480f
Monóxido de carbono, 267
  de carbono, bacterias utilizadoras, 403
Montmorillonita, 607
Moraxella, 96, 100
Morchella, 187
Mortierella, 468
Mosaico del tabaco, 143
  del tabaco, virus, 143, 144f, 145, **147**, 148f
Mosca del vinagre, 365
Motilidad, 65
Movimiento aerotáctico, 71
  deslizante, 140
  deslizante, bacterias con, 122
  quimiotáctico, 71f
Mucor, 170, 468
  mucedo, 178
  racemosus, 179
  rouxii, 386, 387f
Mucorales, 178
  reproducción asexual, 179
Mucoríneas, propagación, 179
Mucosas, bacterias relacionadas, 304
Muerte, fase de un cultivo, 216f
Multinucleada, bacteria, 504f
Multiplicación de bacterias, 23
Muramidasa, 53f
Mureína, 24, **51**, 54, 58, 65, 81, 103
  biosíntesis, 57f
  de *Escherichia coli*, 53f
  enzimas destructores, 55
  sáculo, 52
Muroendopeptidasa, 53
Muscarina, 383
Musgos hepáticos, 446
Mutación(es), 493, 494
  a inestabilidad alostérica, 578
  carácter no direccional, 494, 495f
  espontánea, 496
  expresión, 503
  inducida, 496
por desplazamiento del patrón de lectura, 498f
  puntuales, 497
  silenciosa, 496
  tasa, 496
  tipos, 497
Mutagénesis, 494
Mutagenicidad, prueba, 510
Mutagénicos, agentes, 499f, **500**
Mutante(s) auxotrófico, 281, 503, 505, 506
  auxotrófico defectuoso, 508f
  auxotrófico, método de la penicilina, 507f
  bioquímicamente defectuosos, diferenciación, 506f
  catabólico, 505
  con enzimas biosintéticos constitutivos, 578
  con enzimas catabólicos constitutivos, 577
  con regulación defectuosa, 579
  con sensibilidad modificada frente al efector, 579
  defectivos, regulación, 577
  dependiente de la temperatura, 505
  en la regulación, 505
  enriquecimiento, 506
  frecuencia, 496
  letales condicionales, 508
  por inserción, 503
  resistentes, 505
  resistentes frente a un antimetabolito, 579f
  selección, 504
  selección indirecta por transferencia de calcos, 495f
  supresores, 497
  tipos, 505
Mutualismo, 594
Mycobacterium, 25, 85, 96, 104, 106f, 112
  gordonae, 401f
  leprae, 104
  phlei, 85f
  tuberculosis, 86, 104
Mycoderma aceti, 64, 365
Mycoplasma, 24, 98, 132, 133
  canis, 133
  gallisepticum, 133
  hominis, 133
Mycota, **169**, 172
Myxobacterias, 94f
Myxococcus, 84, 97
Myxosarcina, 98, 135
Myxovirus, 146f

N

NAD, 243, 244, 265
  reacción, 430
  reducción, 430
NADH, 245
NADH-deshidrogenasa, 265, 267
NADH-Q-reductasa, 265
NADH$_2$-ferredoxina-oxidorreductasa, 294
NADP, 241f, 243, 244, 438
  función, 241f
  reducción, 437
NADPH-oxidasa, 273
Naftaleno, degradación, 475, 483
Naftoquinonas, 261
Nannocystis, 97
Nanómetro, 14
Nectria cinnabarina, 186
  galligena, 186
Nefelometría, 210
Neisseria, 74, 94f, 96
  gonorrhoeae, 99
  meningitidis, 100
Neocallimastrix, 461
Neomicina, 225
Neuberg, fermentación, 296
  segunda forma de fermentación, 297
  tercera forma de fermentación, 297
Neumococos, 55, 61
Neumonía bovina, 132
Neuraminidasa, 147
Neurospora, 171, 186
  crassa, 35
Neurotoxinas, 231
Neurotrópicos, virus, 145
Neuston, 129
Nevskia, 98, 128f
  ramosa, 130

Nicho ecológico, 583
Nigrosina, 61
Nitrato, amonificación, 339, **341**
  asimilación, 342
  desnitrificación, 395
  en el hombre, 602f
  reducción, 337
  reducción microbiana en el intestino, 602f
  reductasa B, 342
  respiración, 338f, **339**, **341**, 549
  y fijación de nitrógeno, 448
Nitrato-reductasa, 340, 341, 360
Nitrificación, 390
  heterotrófica, 392
Nitrificantes, bacterias, 391
  papel en el suelo, 391
Nitrito, 500
  oxidación, 390
  reducción, 261
Nitrito-reductasa, 341, 342
Nitrobacter, 9, 46, 94f, 96, 215, 392
  agilis, 390f
  hamburgensis, 390f
  winogradskyi, 389f, 390f
Nitrobacteriáceas, 391
Nitrococcus, 96
  mobilis, 390f
Nitrogenasa, 140, 141, 343, 399, 425, 441, 446, 449, 450f
Nitrógeno, 11
  bacterias de vida libre fijadoras, 447f
  bacterias fijadoras, 441
  cianobacterias fijadoras, 446
  ciclo, 9, 10f
  en el suelo, 341
  fijación, 141, 425, 446, 449f, 596
  fijación con respiración aeróbica, 450f
  fijación, oligoelementos necesarios, 448
  fijación simbiótica, 443f
  hábitats, pobres en, 445
  liberación, 339
  molecular, fijación, 441
  obtención, 195
  regulación de la fijación, 450f
  velocidad de producción, 340f
  vía de asimilación, 281f
  y heterocistos, 140
Nitrosococcus, 46, 94f, 96
  oceanus, **47f**, 390f, 391
Nitrosolobus, 94f, 96
  multiformis, 390f
Nitrosomonas, 9, 46, 79, 90, 94f, 96, 111, 215, 392
  europaea, 389f, 390f, 391
  rendimiento, 394f
Nitrosospira, 94f, 96
  briensis, 390f
Nitrosovibrio, 94f, 392
Nitrospina, 96
NMG acción mutagénica, 499f
NO-reductasa, 340
Nocardia, 75, 85, 96, 104, 105, 106f, 112, 106f, 468, 478
  opaca, 401f
  saturnea, 107f
Nodulación, 442
Nódulos de las leguminosas, bacterias formadoras, 444f
  del tallo, 442, **445**
  radicales, 597
  radicales, bacteroides, 399
  radicales de plantas leñosas, 445
  radicales en leguminosas, 445
Nomenclatura binaria, 89
Nostoc, 98, 136, 137, 446
  muscorum, 138f
Novobiocina, 43, 509
Núcleo, 2, **17**
  bacteriano, 25
  interfásico, 20
  segregación, 504f
Nucleocápsido, 143, 145
Nucleolo, 20
Nucleosomas, 20
Nucleótidos, 27
  repetidos, 514
  síntesis, 282
Número de bacterias, determinación, 209
  de cromosomas, 35
Nutrición, 193
Nutricionales elementales, requerimientos, 193
Nutrientes, deficiencia, 584
  oxidación terminal, 258

O

Océanos, 585
Oceanospirillum, 97
Ocres, bacterias, 113
Oídios, 170, 171f
Okazaki, fragmentos, 33
Okenona, 421, 422
Oligoelementos, requerimientos, 193
Oligonucleótidos, secuencia de bases, 91
Omnipotencia bioquímica, 453
Oncogén, teoría del, 166
Oncogénica, transformación, 163
Oncogénicos, virus, 164
Oogonios, 171
Oomicetos, 171, **176**
Oospora lactis, 183
Operador, 559
Operón(es), 559
  ara, inducción, 562
  arginina, represión, 555f
  inducibles, 559, 560
  lactosa, control, 561
  lactosa, regulación, 560f
  lactosa, represión por catabolito, 561
  reprimibles, 560
  triptófano, represión por producto final, 563
Opinas, 163
Orgánulos, 4
  de locomoción, 22
Orleans, proceso, 365
Ornitina, 52
Ornitina-carbamoil-transferasa, 554, 555
  formación acelerada, 555f
  represión, 554f
Ornitosis, 131
Orto-pirocatecasa, 482
Ortomixovirus, 167
Oscillatoria, 98, 124f, 136f
  agardhii, 78
  princeps, 140
  rubescens, 137
Oscillochloris, 98
Oscillospira guilliermondii, 110
Otomaínas, 488
Oxalacetato, 238, 276f
Oxalacetato-hidrolasa, 370
Oxalacetato-descarboxilasa, 276f

- Oxicloroafina, 87
- Oxidación, 243
  - de sustratos orgánicos, 347
  - del piruvato, 245
  - en punto muerto, 394
  - incompleta, 363
  - terminal, 258
- Oxidación-reducción, reacción acoplada, 331
- Oxidadoras de compuestos orgánicos, bacterias 124f
  - del amonio, bacterias, 392
  - del azufre, bacterias, 588
  - del metano, bacterias, 84
  - del sulfhídrico incoloras, bacterias, 124f
- Oxidasa, 475
  - reacción, 100
- Oxidativa, fermentación, 363
- Óxido de etileno, 230f
- Oxigenación y degradación de hidrocarburos, 475
- Oxigenasa, 334, 374, 472
- Oxígeno, distribución en una colonia, 200f
  - efecto tóxico, 272
  - obtención, 195
  - transporte, 444
  - y compuestos aromáticos, 481
  - y levaduras, 297
- Oxirano, 230
- Oxitetraciclina, 382
- 3-Oxoadipato, 482
  - vía del, 483f
- Oxocarotenoides, 137
- 2-Oxogluconato, 111
- 2-Oxoglutarato, 238
- Oxoglutarato-deshidrogenasa, 257f
- 2-Oxoglutarato-deshidrogenasa, 256, 372, 399, 558, 575
- 2-Oxopropanal, 297

P

- Palindromo, 537
- Pan, elaboración, 12
- Pantanos, 454
- Pantotenato, 241f
- Panza de los rumiantes, 291, 295, 310, 331, 458f, 583, 597, 599
- de los rumiantes como cultivo semicontinuo, 459
  - de los rumiantes, saturación de grasas, 460
  - de los rumiantes y lactato, 459
- Papel, fabricación, 300
- Paperas, 146f
- Papiloma, 146f
- Papovirus, 146f
- PAPS-reductasa, 345f
- Par especial P 870, 432
- *Paracoccus*, 94f, 96
  - *denitrificans*, 260, 266f, 341, 400, 401f
  - *denitrificans* y producción de nitrógeno, 340f
- Parafina, degradación, 480f
  - ß-oxidación, 479
- Parainfluenza, virus, 146f
- Parálisis postdiftérica, 102
- Parasexuales, procesos, 511
- Parásitas obligadas, bacterias, 98, **130**
- Parasitismo, 594, 602
- *Parasporia parviflora*, 446
- Pared celular, 50
  - celular bacteriana, 51
  - celular, esqueleto, 52
  - celular, inhibición de la síntesis, 226
- Partícula vírica, 145
- Pasteur, efecto, 296, 297, 572
  - regulación de la reacción, 299
- Pasteurización, 226-228
- Patata, podredumbre, 177
  - virus, 143
- Patógenas, bacterias, 603f
- Patogenicidad, factores, 534
- Patógenos de animales, virus, 144
  - humanos, virus, 167
- Patrón de lectura, desplazamiento, 498f
- PBH, 388
- Peces marinos, órganos luminosos, 599
- Pectina, 9
  - degradación, 466
- Pectinasa, 13, 315
  - utilización, 387f
- Pectinolíticos, enzimas, utilización, 387f
- *Pediococcus*, 96, 98, 100
- *Pedomicrobium*, 129
- Pedunculadas, bacterias, 98, 128f, 130
- *Pelochromatium roseum*, 416
- *Pelodictyon*, 78, 98, 415, 418
  - *clathratiforme*, 415, 416f, 417f
- *Pelonema*, 78
- *Peloploca*, 78
- Penicilín-acilasa, 380f
- Penicilina, 13, 55, 57, 99, 104, 115, 131, 186, 226, 352, 375, 380
  - acción, 54
  - G, puntos de ataque, 380f
  - sintética, 380
  - y *Escherichia coli*, 56f
- Penicilinasa, 380, 533
- *Penicillium*, 170, 185, 186f, 367, 387f
  - *camemberti*, 186
  - *chrysogenum*, 186, 380
  - *chrysogenum*, degradación de la glucosa, 254f
  - *notatum*, 186, 375, 380
  - *roqueforti*, 186
- Pentosa(s)fosfato, 254f
  - regeneración, 405
  - vía, 237f, **251**
  - vía oxidativa, 247
- Peptidil-transferasa, 225
- Pepto-clostridios, 110
- *Peptococcus*, 96, 99
  - *anaerobius*, 326t
- Peptonas, 487
- *Peptostreptococcus*, 96, 99
- Percolación, aparato, 201f
- Peridio, 176
- Período de latencia, 155
- Periplásmico, espacio, 52, 60
- Peritecio, 182, 183f
- Permeasa, 45, 284f, 286, 463, 561
- Peronosporales, 176
- Peroxidasa, 273
- Persistencia, formas, 79
- Peste, 315
- Petróleo, 8, 13, 453
  - contaminación por, 484
- *Petunia*, 163
- *Peziza*, 187
- pH del medio de cultivo, 196
  - y bacterias, 197f
  - y hongos, 197f
- PHA, 75, 388
- *Phanerochaete chrysosporium*, 471, 486
- *Pholas dactylus*, 321
- *Phormidium*, 98, 136
- *Photinus pyralis*, 322
- *Photobacterium*, 97, 321

Phycomyces blakesleeanus, 178
Physarum polycephalum, 176
Phytomonas, 90
Phytophthora infestans, 176
Picomicetos, hifas, 169f
Picornavíridos, 146f, 167
Piericidina A, 267
Pigmentación, metabolitos secundarios, 88
Pigmentos, 409
  amarillos verdosos fluorescentes, 87
  antena, 422, 431
  bacterianos, 84
  del aparato fotosintético, 419
  fúngicos, 84
  localización, 422, 435
  protohimínicos, 110
  síntesis, 422
Pili, 69
  F, 69, 522, 523f
  sexuales, 69
Pilobolus, 179
  esporangióforo, 179f
Pinocitosis, 21
Piocianina, 85f, 87
Piocina, 534
Piógeno, 99
Pirenomicetos, 182, 183f, **186**
  ciclo biológico, 186
Piridín nucleótidos, 243
  nucleótidos reducidos, 272
Piridina como dador de electrones, 430
Piridoxina, 241f
Pirimidinas, 194
Pirita, 604, 607
Pirofosforilasa, 576
Piromicina, 382
Pirroloquinolín-quinona, 477
Piruvato, 247, 248f, 250, 275
  deshidrogenación, 255, 256f
  escisión, 318
  formiato-liasa, 294
  oxidación, 245
Piruvato-carboxilasa, 275, 276f, 574
Piruvato-descarboxilasa, 296, 301, 302, 319, 574
Piruvato-deshidrogenasa, 256, 575
  complejo enzimático, 245
  y bacterias anaeróbicas estrictas, 256
Piruvato-ferredoxín-oxidorreductasa, 255, 294, 333
Piruvato-formiato-liasa, 255, 318
Piruvato-formiato-oxidorreductasa, 255
Piruvato-ortofosfato-diquinasa, 276f
Piruvato-quinasa, 247, 250, 275, 293
Piruvato-sintasa, 357
Planctomyces, 93f, 98
Planogametos, 171
Plantas, especies relacionadas, 303
  leñosas, nódulos radicales, 445
  reino, 1
  verdes, fotosíntesis, 438
  verdes, membrana fotosintética, 436f
Plasma sanguíneo, sustitutivo, 386
Plásmido(s), 4, 36, 527, 528
  2,4-D, 534f
  CAM, 534f
  ColE1 de *Escherichia coli*, 528f
  como transbordadores de genes, 528
  conjugativos, 530
  crípticos, 532
  de resistencia, 532
  degradativos, 534f, 535
  helper, 532
  incompatibilidad, 529
  inductor de tumores, 164
  inductor de tumores de *Agrobacterium tumefaciens*, 535
  información, 23
  lineales, 532
  metabólicos, 535
  movilización, 532
  NAH, 534f
  NIC, 534f
  número de copias, 528
  OCT, 534f
  pBR322, 544
  pC194 de *Staphylococcus aureus*, 531
  propiedades físicas, 529
  RP4 del grupo IncP1, 531
  RSF1010 del grupo IncQ, 531
  SAL, 534f
  significación biológica, **532**
  Ti, 163
  TOL, 534f
  y cáncer, 162
  y tumores, 162
Plasmogamia, 170
Plasmólisis, 50
Plasmopora viticola, 177
Plastocianina, 435
Plastoquinona, 261, 435
Plecténquima, 169
Plectomicetos, 182, 183f, **185**
Plectonema, 98, 136
Pleomorfismo, 494
Pleurocapsa, 98, 135
Pleuroneumonía, 132
Pneumococcus, 90
Podangium, 126f
Poder reductor, 428
Podredumbre blanca de la madera, 471
  de la patata, 177
  parda de la madera, 470
Pogonóforos, 597
Polaridad, 499
Poli hidroxiácidos grasos, 75
  hidroxialcanoatos, 75
Poli-ß-hidroxibutirato, 138, 402
Poliédricos sin vuelta, virus, 148
Polifosfatos, 76
  de cadena larga, **76**
Poligalacturonasa, 466
Polihidroxialcanoatos, 388
Polímeros, síntesis, 237f
Polimixina, 382
  B, 382, 383f
Polinucleótido-ligasa, 541
Polinucleótido-quinasa, 160
Polio, 146f
Poliol-deshidrogenasa, 365
Polioma, 146f
Poliomielitis, 144
  virus, 145f
Polirribosomas, 38
Polisacáridos, 73
  de reserva, síntesis, 576
  degradación intracelular, 462
  hidrólisis, 463
  movilización, 463
  O-específicos, 60
  reutilización, 463
Polisomas, 38, 43
Pólvora, 390

- *Polyangium*, 97, 126f
- Porfirinas y bacterias lácticas, 303
- Porinas, 60
- Porqueros, enfermedad 122
- Potasio en el agua marina, 12f
- Potencial de protones, 286
  - en la transferencia de grupos, 245
  - redox, **263**, 264f, 265f
- PPLO, 132
- PQQ, función, 241f
- Precámbrico, fósiles, 610
- Presión osmótica de medios de cultivo, 198
- *Primasa*, 34f
- Priones, 167
- Proactinomicetos, 105
- Procariotas, 2, **4**
  - árbol filogenético, 5, 91
  - células, 22
  - diferenciación, 4
  - diversidad, 95
  - evolución, 608
  - fototróficos, 446
  - grupos, 95
  - pared celular, 24
  - ribosomas, 23
  - taxonomía, 89
- Procarióticas, células, 23f, 611
- Proceso(s) de Orleans, 365
  - microbiológicos clásicos, 12
- *Prochloron*, 142
- *Prochlorothrix hollandica*, 142
- Proclorales, bacterias, 141
- Prodigiosina, 85f, **87**
- Producción de un cultivo, 217
  - pesquera, 586
- Productores, 7
- Productos cárnicos, 310
  - lácteos, 12
  - naturales, degradación, 453
  - naturales fermentables, 334
- Profago, 157
  - e inmunidad, 158
- Profase, 18f
- Prolina, síntesis, 282f
- Promotor, **39**, 558
- Propano, degradación, 477
- Propano-3-ólido, 230
- 2-Propanol, 12, 326
- ß-Propiolactona, 230
- Propionato, formación, 312f
- Propionibacterias, 103, 276, **310**, 384
- *Propionibacterium*, 96, 360
  - *acidipropionici*, 311
  - *acnes*, 311
  - crecimiento, 311
  - *freudenreichii*, 311
  - *freudenreichii shermanii*, 311
  - metabolismo, 311
  - *pentosaceum*, 311
- Prostecadas, bacterias, 98, 128f
- Prostecas, 129
- Prostético, grupo, **240**, 241f, 242f
- *Prosthecochloris*, 98
- *Prosthecomicrobium*, 98, 128f, 129
- Proteasas, 386, 486, 487
  - extracelulares, 488
  - termoestables y bacterias termófilas, 488
  - utilización, 387f
- Proteica, síntesis, 40, 42f
- Proteínas, 36, 37
  - de unicelulares, 388
  - degradación, **486**, 487f
  - enzimáticas, 40
  - esqueleto carbonado, 491
  - estructura secundaria, 37
  - Fe-S, 261
  - reguladoras, 558, 563
  - ricas en cisteína, 82
  - semidigeridas, 487
  - síntesis, 13
  - síntesis y antibióticos, 225
  - sulfoférricas, 45, 260, 431, 434, 449
  - tardías, 155
  - tempranas, 155
  - traslocadoras, 286
- Proteinasas, 13, 332
- Proteobacterias, 92, 94f
- *Proteus*, 97
  - características, 314f
  - *mirabilia*, 68f
  - *vulgaris*, 69, 314, 489
- Protistos, 2
  - inferiores, 2
  - reino, 1
  - superiores, 2
- Protoascomicetos, 183
- Protocatecuato, 485f
  - y degradación de anillos aromáticos, 481
- Protocatecuato-3,4-dioxigenasa, 482
- Protocitos, 17
- Protohemo, 444
- Protohormonas, 545
- Protómeros, 148
- Protones, bomba impulsada por la luz, 437, 439
  - gradiente, 437
  - potencial, 286
  - transporte, 269
- Protoplastos, 20, **55**
  - y transformación de bacterias, 518
- Protoporfirina, 503
- Prototrofa, cepa, 506
- Protoxina, 78
- Protozoos, 597, 598
  - de la panza, 459
- Pseudomonadáceas, 111, 373
- *Pseudomonas*, 15f, 24, 65, 94, 96, 100, 111 112, 118f, 196, 197, 387f, 468, 476, 482
  - *aeruginosa*, 85f, 87, 111, 289, 341, 385f
  - *aeruginosa*, degradación de la glucosa, 254f
  - *carboxidoflava*, 401f
  - *carboxidovorans*, 389f, 400, 401f, 403
  - *denitrificans*, 202
  - *facilis*, 401f
  - *fluorescens*, 111, 341
  - *fluorescens cellulosa*, 457
  - *indigofera*, 85f, 87
  - *procyanea*, 111
  - *pseudoflava*, 401f
  - *putida*, 87, 111, 289
  - *pyocyanea*, 87
  - *saccharophila*, 111, 254f
  - *stutzeri*, 341
  - *syringae*, 111
- Pseudouracilo, 39
- Psicrofilia, 199
- Psitacosis, 131
- PTS, 288f
- Puentes de hidrógeno, **29**, 30, 37f
- *Pullularia*, 185
  - *pullulans*, 185
- Pulque, fabricación, 301
- Pulquerrimina, 85f, **87**
- Pululanasa, 386, 463-465
- Pululano, 465
  - utilización, 385f
- Purinas, 194
- Purpúreas, bacterias, 428
- Putresceína, 488
- *Pyrococcus*, 97

Pyrodictium, 97
  brockii, 351
  occultum, 117, 199, 351
Pyronema confluens, 188
  omphalodes, 188

Q

Quelato cálcico, 80
Querógeno arcaico, 608
Queso de Harz, 596
Quimioclina, 589
Quimiolitoautotrofia, 397
Quimiolitoheterotrofia, 347
Quimiolitotrofas aeróbicas, bacterias, 389
  bacterias, 112
  bacterias, condiciones de enriquecimiento, 206f
Quimiolitotrofia, 389
Quimiolitotróficas, bacterias, 586
  bacterias aeróbicas, 400
Quimioorganotrofas,
  bacterias, condiciones de
  enriquecimiento, 206f
Quimiosmótica teoría, 271
Quimiostato y concentración de sustrato, 221f
  y densidad celular, 221f
  y rendimiento en equilibrio dinámico, 221f
  y tiempo de duplicación, 221f
Quimiotáctico, movimiento, 71f
Quimiotaxis, **69**, 71
Quimiotrofos, organismos, 203
Quinonas, 261
Quitina, 51
  degradación, 468
  descomposición, 105
Quitinasa, 465, 469
Quitobiasa, 469
Quitridiomicetos, 176

R

Rabia, 144, 545
Radiación(es) gamma, 230
  ionizantes, 230, 232, 502
  ultravioleta, 230
  ultravioleta, acción mutagénica, 499f
  ultravioleta, protección, 84
Rafinosa, 601f
Ramnosa, 62
Rauwolfia, 163
Rayos X, acción mutagénica, 499f
Reacción acoplada de oxidación-reducción, 331
  catalizada, velocidad, 239
  de hinchamiento, 62
  de Pasteur, regulación, 299
  de primer orden, 212
  de Stickland, 330
  de Stickland positiva y clostridios, 325f
  de terror, 72
  oscura de la fotosíntesis, 428
  redox fotoquímica, 430
Reactivación en la oscuridad, 502, 509
Recombinación de DNA,
  aspectos de seguridad, 546
  de sitio específico, 512, 514f
  de sitio específico doble, 513
  de sitio específico único, 513
  génica, 511, 512, 522
  por conjugación, 521f
Reconocimiento, 90
  de las endósporas, 79
Redox, discontinuidad de un lago, 589
Reducción, 243
  asimilatoria del sulfato, 345f, 346
  decimal, tiempo de, 226
  del azufre, 350
  del sulfato, 345
  disimilatoria del nitrato, 339
  disimilatoria del sulfato, 346
  reacción de, 404
Reductor, poder, 428
Reductoras de nitratos, bacterias, 274
  de sulfatos, bacterias, 94f, 348f, 446
  del azufre, bacterias, 274
Reduplicación semiconservativa del DNA, 32f
Región *attB*, 514f
  attl, 514f
  mob, 532
Regla de superficie de Rubners, 14
Regulación autógena, 563
  enzimática, mecanismos, 558, 564
Relación superficie/volumen, 14
Rendimiento celular, 394
  de un cultivo bacteriano, 216
Renina, 386
  utilización, 387f
Reovirus, 146f
Replicación continua, 34f
  del DNA, **30**, 31f
  del DNA, mecanismo semiconservativo, **32**
  discontinua, 34f
Represión enzimática, 550
  multivalente, 556f
  por catabolito, **278**, 551, 556f, **557**, 560f
  por producto final, 550, 554, 562f
Represor, 558
Reproducción por gemación, 23
Requerimientos nutricionales elementales, 193
Resazurina, 203
Reserva, materiales, **73**, 425
  síntesis, 573f
Resistencia a los fagos, 155
Resolvasa, 515
Respiración aeróbica y fijación de nitrógeno, 450f
  anaeróbica, 4, 337, 361, 399
  con oxígeno, 338f
  de carbonatos, 338f, 354
  de la glucosa, balance energético, 268
  de nitratos, 338f, **339**, 341, 549
  de sulfatos, 338f, 344
  del azufre, 338f, 350
  del fumarato, 319, 338f, 359
  del hierro, 338f
  del sustrato y transporte de protones, 269f
  y energía para la fijación de nitrógeno, 449
  y membranas, 260
Respiradores de azufre, 116, 117

Respiratoria, cadena, 237
  tasa, 285f
Restricción, análisis, 539
  mapas, 538f
Retículo endoplasmático, 20
Retromutación, 497
Retrovirus, 146f, **168**
  ciclo de desarrollo, 165
  humanos, 516
  vectores basados en, 545
  y formación de tumores, 164
Reversión, 497
Rhizobium, 94f, 96, 112, 163, 442, 445
  leguminosarum, 444f
  lupini, 444f
  meliloti, 444f
  phaseoli, 444f
  trifolii, 442, 444f, 450
Rhizophidium pollinis, 176
Rhizopus, 170, 367
  arrhizus, 178
  nigricans, 178, 179
  nigricans, ciclo biológico, 180f
  nigricans, reproducción sexual, 180
  oryzae, 178
  rouxii, 178
  stolonifer, 179
Rhodobacter, 94f, 98, 414, 423
  sphaeroides, centro de reacción, 432
  transporte de protones, 436f
Rhodocyclus, 94f, 98, 414
  purpureus, 414
Rhodomicrobium, 90, 94f, 98, 128f
  vannielii, 129, 414, 415f
Rhodopila, 94f, 98
  globiformis, 414
Rhodopseudomonas, 94f, 98, 111, 414
  acidophila, 424
  palustris, 485
  viridis, 419
  viridis, centro de reacción, 431
Rhodospirillum, 94f, 98
  fulvum, 413, 414f
  molischianum, 413
  photometricum, 413
  rubrum, 46, 413, 414f
  sphaeroides, 411f
Rhodotorula, 85, 87, 185
Rhytisma acerinum, 187
Ribitol, 54
Riboflavina, 241f, 384
Ribonucleico, ácido, 2
Ribosa-bifosfato, 403
Ribosa-5-fosfato, 251, 283
Ribosomas, 4, 23, 36, 38, 41
  bacterianos, 39f
  de procariotas, 23
Ribulosa-bifosfato, 79, 396, 398, 404
  ciclo, 403, 406, 609
Ribulosa-bifosfato-carboxilasa, 22, 79, 398, 403, 415
Ribulosa-5-fosfato, 251
Ribulosa-fosfato-carboxilasa, 396, 404f
Ribulosa-monofosfato, ciclo de la fijación de aldehído, **476**, 477f
Rickettsia, 98
  prowazekii, 130, 131
  typhi, 131
Rickettsias, 98, 130
Rifampicina, 43
Rinovirus, 167
Ristocetina, 382
Rizobios, 449, 450
  simbiosis, 441
  y leguminosas, 21
Rizosfera, 447, 596
RNA, 2
  constitución, 39
  vírico, replicación, 43
RNA-polimerasa, 39, 43
  DNA dependiente, 115, 225, 559
RNAm, 39, 40
  traducción, 40
RNAr, 20, 90, 91, 93f
  16S, **91**, 92, 93f
  regulación de la síntesis, 564
RNAt, 20, 40
  regulación de la síntesis, 564
Rocas ferruginosas bandeadas, 6
  graníticas, 604
Rodopina, 421
Rodopinal, 421
Rodospiriláceas, 134, **413**, 423, 424
  características, 410f
  distribución, 425
  transporte fotosintético de electrones, 432
Roidenona, 421
Rojas alfa, bacterias, 92
  bacterias, 78, 93f
  bacterias, árbol genealógico, 94f
  bacterias, fotorreacción, 431
  beta, bacterias, 92
  del azufre, bacterias, 134, 409, 411f, 446
  del azufre y aguas someras, 426f
  delta, bacterias, 92
  fotosintéticas, bacterias, 48f
  fototrofas, bacterias, 46, 72, 92
  gamma, bacterias, 92
  sin azufre, bacterias, 134, 409, 411f, 446
  sin azufre, bacterias y oscuridad, 424
Rojo congo, 61
  de metilo, prueba del, 316, 317
Rotenona, 267
Rubners, regla de superficie, 14
Rumiantes, transformaciones microbianas en el estómago, 458f
Ruminococcus, 96, 99, 327
  albus, 295, 331
Ruminohepático, ciclo, 460

S

Sacarosa, 62, 246f
Saccharomyces cerevisiae, 183f, 184f, 185, 295, 296, 300
  rouxii, 198
Sáculo de mureína, 52
Salazón, 232
Salitre, 390
Salmonella, 74, 97, 114, 134
  características, 314f
  especies, 59
  paratyphi, formas coloniales, 59f
  typhimurium, 59, 315, 519
  typhimurium, polisacáridos, 60
Salvarsán, 122
Sanger, método desoxi, 540f
Saprolegnia, 176

  ciclo biológico, 177f
  diplania, 178
  reproducción sexual, 178
Saprospira, 97, 124f
  grandis, 124
Sarampión, 144, 146f
Sarcina, 23, 85f, 96, 99
  aurantiaca, 99
  flava, 99
  lutea, 99
  ventriculi, 51, 64f, 99, 197, 301
Sarcoma, 146f, 166
  de Rous, virus, 164
Sarcomicetáceas, 183
Sarna de la patata, 395
Sarro dental, 122
Scarpie, 167
Schizosaccharomyces, 170
Sclerotinia sclerotiorum, 187
Secuencias anapleróticas, 238
  del DNA, homología, 36
  firma, 92
Sedimentos, zonas anaeróbicas, 295
Sedoheptulosa-1,7-bifosfatasa, 476
Segregación nuclear, 504
Selenocisteína, 41f
Selenomonas, 65, 97, 114, 119
  ruminantium, 68f, 119, 263, 313, 459, 460
  sputigena, 119
Seliberia, 98
Semialdehído del ácido tartrónico, 278
Semiconservativo, mecanismo, 31
Semillas de soja, 12
  esterilización, 231
Semiquinona, 435
Semliki Forest, virus, 146f
Sephadex, 386
Serina, síntesis, 282f
  vía de la, 476, 478f
Serotransferrina, 290
Serratia, 97, 320
  características, 314f
  marcescens, 85f, 87, 315
Sesbania, nódulos, 444f
SFV, 146f
Shepherdia, 445
Shigella, 97, 114
  características, 314f
  dysenteriae, 59
SIDA, 167
Sideróforos, **87**, 289, 290f
Siembra por agotamiento, 207f
Sífilis, 122
Sílice, yacimientos, 606
Silicio en el agua marina, 12f
Silvestre, tipo, 493
Simbiontes de la soja, 442
Simbiosis, 593
  antagónicas, 602
  en la panza de los rumiantes, 597
  funciones, 594
  intracelular, 21
  mutualista, 594
  mutualista con vegetales, 596
  mutualistas con animales, 597
Simbióticas, bacterias, y fijación de nitrógeno, 441
Simian virus, *véase* SV40
Simonsiella, 98
  crassa, 123f
Simporte, 286
Sinapinol, 469
Síndrome de la inmunodeficiencia adquirida, 167
Síntesis enzimática, regulación, 551
  proteica, 40, 42f
Sintetasa, 41
Sintrofía, 595
Sintrofismo, 281
Sistema(s) fosfoenol piruvato:glucosa fosfotransferasa, 288f
  redox y cadena respiratoria, 265
Soja, nódulos, 444f
  semillas, 12
  simbiontes, 442
Solución madre de oligoelementos, 194f
  nutritiva, 194f
  vitamínica, 194f
Sonda de DNA, 14
  genética, 544
Sordaria fimicola, 186
Soróforo, 174
SOS, reparación, 509
Sphaerotheca mors-uvae, 186
Sphaerotilus, 97
  natans, 63, 77, 112, **113**, 592
Spirillum, 65, 97, 134, 394
  volutans, 76, 117
Spirochaeta, 97, 121
  plicatilis, 122
  zuelzerae, 121
Spirogyra, 72
Spiroplasma, 98, 132, 134
  citri, 134
Spirulina, 98, 124f, 136
Sporobolomyces, 189f
  salmonicolor, 87, 190
Sporocytophaga, 84, 97, 125, 126, 127f, 457, 462
  myxococcoides, 461
Sporolactobacillus, 79
  inulinus, 302, 310
Sporosarcina, 79
  ureae, 109, 489
Staphylococcus, 96, 99, 231
  aureus, 53, 57f
Starters de lactobacilos, 310
  mesófilos, 309
  termófilos, 309
Stibiobacter senarmontii, 397
Stickland positiva, reacción, 325f, 330
Stigmatella, 97, 126f
Streptobacillus moniliformis, 134
Streptococcus, 96, 98, 100, 304, 305f, 466
  bovis, 304
  cremoris, 309
  lactis, 263, 303, 309
  mutans, 62, 63
  pneumoniae, transformación, 517f
  salivarius, 62, 63
  salivarius thermophilus, 309
  thermophilus, 310
Streptomyces, 54, 96, 105, 106f, 107f, 387f, 468
  aureofaciens, 105, 382
  fradiae, 374
  griseus, 105, 381, 469
  griseus, degradación de la glucosa, 254f
  venezuelae, 105
Streptosporangium, 96, 105, 106f, 108
Streptothrix, 97
Sublimado alcohólico, 231
Succinato, 224f, 238, 318f, 319
  formación, 358, 359f
Succinato-deshidrogenasa, 224, 225, 256, 257f, 258

Succinato-quinasa, 257f
Succinato-tioquinasa, 257
Succinil-CoA, 257, 312
Succinivibrio, 97, 114, 119
Suelo(s), bacterias del, 104
  básicos, 474
  capas impermeables arcillosas, 486
  flora autóctona, 102
  minerales, 474
  pobres, colonización, 447
  ricos en humus, 474
Suero antisífilis, 121
Sulfanilamida, 224
Sulfato, bacterias reductoras, 605
  cálcico, depósitos, 605
  fermentación sin, 347
  reducción, 337, 343, 345
  reducción asimilatoria, 11f, 345f, 346
  reducción disimilatoria, 346
  respiración, 338f, 344
Sulfhídrico, 10
  formación, 343
  oxidación, 588
Sulfito de hidrógeno, 297
  reducción, 261, 346
Sulfito-reductasa, 343, 345f, 346
Sulfoférricas, proteínas, 260
Sulfoférrico, centro, 432
Sulfogénicas, bacterias, 291
Sulfolobus, 97, 199, 394, 398
  acidocaldarius, 116, 199, 397
  acidocaldarius, pH, 395f
Sulfonamida, 131
Sulfuro de hidrógeno, 396, 426, 427
  de hidrógeno magmático, 395
  de hidrógeno, oxidación, 424
Sulfurogénicas, bacterias, 400
Sumergidos, procesos, 365
Superficie de Rubners, regla, 14
Superoxidantes, 364
Superóxido-dismutasa, 273
Suplementos, 194
Sustancias, asimilación, 283
  transformación, 373
Sustrato(s), alternancia, 577
  concentración y crecimiento de células, 220f
  curvas de saturación, 285f, 565f
  fosforilación, 243, 250
  orgánicos, asimilación, 347
  orgánicos, oxidación, 347
  reconocimiento por el enzima, 239
SV40, 40, 146f, 149f, 164
  forma, 164
  transformación oncogénica, 164
Synchytrium endobioticum, 176
Synechococcus, 98, 135, 136f
  lividus, 137

T

Tactismos, 69
Takadiastasa, 464
Tallo, nódulos, 445
Talo cenocítico, 176
Tartronato-semialdehído-reductasa, 278f
Tartronato-semialdehído-sintasa, 278f
Tasa respiratoria, 15f
Taxias, 69
Taxonomía, 90
  numérica, 90
Técnica de Hungate, 352
  de los hibridomas, 545
Tecnología genética, 13
Telofase, 18f
Temperatura y bacterias, 199
Teoría del oncogén, 166
  endosimbiótica, 21
Terminador, **40**, 559
Termitas xilófagas, 455, 598
Termoacidófilas, bacterias, 115, **116**
Termobacterias, 305f
Termoclina de un lago, 589
Termófilas, bacterias, 199
Termófilos extremos, organismos, 199
Termolábiles, sustancias y esterilización, 229
Termopena pallidum, 121
Termoproteales, 116
Termorresistencia de las esporas, 79
Termotolerancia, 199
Terramicina, 382
Test de Ames, 510, 511f
  de difusión de placa, 379f
  de diluciones seriadas, 379
Testosterona, 402
Tétanos, 332
Tetraciclina, 105, 225, 381f, 382
Tetrahidrofolato, 224, 241f
Thermoactinomyces vulgaris, 108, 199
Thermococcus, 97, 117
Thermodiscus, 97, 117
Thermoplasma, 97
  acidophilum, 116
Thermoproteus, 97
  neutrophilus, 117
  tenax, 117
Thermotoga, 93f
Thermus, 96
  aquaticus, 199
Thiobacillus, 11f, 79, 94f, 96, 197, 272
  denitrificans, 341, 394
  denitrificans, pH, 395f, 395f
  ferrooxidans, 389f, 394, 397, 398, 604
  ferrooxidans, pH, 395f
  ferrooxidans, rendimiento, 394f
  intermedius, 394
  intermedius, pH, 395f
  neapolitanus, 394f
  novellus, 394
  novellus, pH, 395f
  thiooxidans, 389f, 394, 398, 604
  thiooxidans, pH, 395f
  thioparus, 394
  thioparus, pH, 395f
Thiobacterium, 96
Thiocapsa, 94f, 98
  pfennigii, 48f, 413, 419
  roseopersicina, 413
Thiocystis, 94f, 98
  gelatinosa, 411f, 413
  violacea, 411f, 413
Thiodictyon, 78, 98, 411f, 413
  elegans, 417f
Thiomicrospira, 394, 394
  pelophia, pH, 395f
Thiopedia, 98, 413
Thioplaca, 98, 396
Thiosarcina, 98
Thiospirillopsis, 124f
  floridana, 124
Thiospirillum, 65, 94f, 98
  jenense, 22, 66, 69f, 411f, 413
Thiothrix, 11f, 77f, 98, 124

Thiovulum, 77f, 96, 396
Tiamina, 241f
Tiaminadifosfato, 241f
Tiempo de generación, 208, **211**
Tierra, edad, 6f
Tifus exantemático endémico, 131
  exantemático epidémico, 131
  exantemático murino, 131
Tilacoides, 21, **137**, 409, 422
  gradiente de protones, 437
  membranas, 433
  polaridad, 433
Timina, 27, 28, 30, 40
Tinción de esporas, 79
  de Gram, 50
Tinta china, 61
Tiobacilos, 111
Tiolasa, 326
Tiometilgalactósidos, 578
Tiosulfato, 424
Tipos O-antigénicos, 60
L-Tirosina, 373
Tirosina, síntesis, 282f
Titulación, 151
TMV, 143, **147**
Togavirus, 146f
Torula, 301, 310
Torulopsis, 185
Toxinas BT, 535
  de enfermedades humanas, 603f
Tracoma, 131
Traducción, **40**, 43
  clave, 40
  código, 40
Transacetilasa, 561
Transaldolasa, 251, 406
Transaldolasa-transcetolasa, 283
Transaminación, **280**, 489
Transcetolasa, 251, 405, 476
Transcripción, **39**, 43
Transcriptasa inversa, 43, 164, 165, 541
Transducción, 512, **519**
  específica, 519, 520
  inespecífica, 519, 519f
Transferencia de calcos, 495f
  de grupos, potencial en la, 245
  y factor F, 524f, 527
Transformación, 512, **516**
  oncogénica, 164
  posibilidades, 517
Transglucolización, 463
Transhidrogenasa, 253
Translocación de grupo, 284f, 286, **288**
Translocasa, 286
Transportadores electrónicos, localización, 435
Transporte activo, 284f, 286
  de electrones, 45
  de electrones y fosforilación, 259
  de hierro, 289, 290f
  de iones y membrana citoplasmática, 288f
  de nutrientes, 284
  de oxígeno, 444
  de protones y respiración del sustrato, 269f
  electrónico respiratorio, 284
  inverso de electrones, 272
  primario, 284
  secundario de membrana, 284
Transposasa, 514
Transposición, 514
Transposones, 502, **515**
  gigantes, 503, 516
  reconocimiento, 516f
Trasplantes, 546
Trébol, 442
  nódulos, 444f
Tremelales, 190
Treonina, síntesis, 282f
Treonina-desaminasa, 570
Treponema, 97, 121
  macrodentium, 122
  pallidum, 121, 122
  pertenue, 122
Treponematáceas, 122
Trichoderma viride, 387f
Tricomas, 140
Triglicéridos, 75
Trioquinasa, 476
Triosa(s)fosfato, 398, 404, 406, 609
  deshidrogenasa, 244
  isomerasa, 248, 306, 405
Tripletes, 40
  desplazamiento, 498f
Triptófano, degradación, 553
  síntesis, 282f
Trofofase, 215, 216
Trufas, 187
Tuber, 187
Tuberales, 183
Tuberculosis, 86, 103, 104
Tubos de fermentación, 316
Tumores, 164
  animales y DNA, 163
  benignos, 164
  malignos, 164
  vegetales, formación, 162
  y retrovirus, 164
  y virus, 162
Tundra, 454
Turbidostato, crecimiento en, 221

U

Ubiquinona, 261, 431, 432
UDP-ácido murámico pentapéptido, 57
UDP-azúcar, 65
UDP-glucosa, 246f
UHT, leche, 228
Ultravioleta luz, 158, 502
Uncinula necator, 186
Uncínulo, forma de, 181
Undecaprenil-difosfato, 56, 65
Undecaprenil-fosfato, 56
Unidad bioquímica, principio, 237
Unión D-alanil-*m*-Dpm, 55
UQ, función, 241f
Uracilo, 40
Urea, degradación, 109
Ureaplasma, 132
Ureasa, 109, 489
Uredinales, 190
Urocanato, 563
Uroquinasa, 387, 545
Ustilaginales, 190

V

Vacunas, 146f, 545
  productores, 545
Vacuolas de gas, 78, 139
Vaina, **63**, 137
  bacterias con, **97**, 112
Valina, 382
  degradación, 313
  síntesis, 282f
Valinomicina, 287, 382
Valinomicina-K, 382
Vanadio, 449
  en el agua marina, 12f
Varicela, 144, 146f, 151
  simplex, 146f
Vectores basados en retrovirus, 545

  de clonación pSUP202, 538f
Vegetal(es), reino, 4f
  virus, 143
Veillonella, 96
  alcalescens, 100, 263, 311, 313, 459
Verbascosa, 601f
Verdes, bacterias, 78
  del azufre, bacterias, 93f, 134, 415, 426
Verrugas y virus, 145
Vesículas, 20
Vía(s) biosintética de los ácidos grasos, 575
  biosintéticas, primer enzima, 570
  biosintéticas ramificadas, 571
  biosintéticas ramificadas, regulación, 555
  de asimilación del nitrógeno, 281f
  de Entner-Doudoroff, 402, 424
  de la 2-ceto-3-desoxi-6-fosfofructoquinasa, 574
  de la fosfofructoquinasa, 573
  de la fructosa-bifosfato, 311, 324, 424, 574
  de la serina, 476, 478f
  degradativa de la leucina, 490f
  degradativas, regulación, 553
  del acriloil-CoA, 313
  del 2-ceto-3-desoxi-6-fosfogluconato, 301
  del metilmalonil-CoA, 312f, 360
  del 3-oxoadipato, 483f
  metabólicas bacterianas, 5
  metabólicas sobre sustrato de acetato, 277f
  metabólicas sobre sustrato de ácido glioxílico, 277f
  oxidativa del acetil-CoA, 347
  reductiva del acetil-CoA, 334, 347, 356, 608, 609
Vibrio, 24, 94f, 97, 321
  cholerae, 67, 117, 315
  fischeri, 322
  metchnikovii, 65, 67f
Vibrios, 117
  anaeróbicos estrictos, 119
Vida, inicio, 581
Vidrio, desinfección, 231
Vinagre, 12
  producción, 365
Vinos, 12
  alemanes, 301
Violaceína, 85f, **87**
Viriones de simetría cúbica, 147
  de simetría helicoidal, 147
Viroides, 166
Viruela(s), 144
  locas, 144
  virus, 151
Virulencia, factores, 534
Virus, 2, 143, 145
  clases morfológicas, 146f
  clasificación, 145
  de la hepatitis B, 545
  de simios 40, 164 *véase también* SV40
  estructura, 146f
  formas, 145f
  y tumores, 13, **162**
Vitamina(s), 384
  B_{12}, 313, 329, 384, 427
  C, 384
  y sintrofía, 595
Vitreoscilla, 94f, 98, 123f, 124f
Voges-Proskauer, reacción, 316, 317
Volutina, 76, 77, 117

W

Waldhof, sistema, 201
Warburg-Dickens-Horecker, 247
Watson y Crick, modelo, 28
Weil, enfermedad, 122
Wolinella succinogenes, 263, 331
Wood-Werkman, reacción, 311

X

Xantanas, 112
  utilización, 385f
Xanthobacter, 112
  autotrophicus, 401f, 446, 447f, 449
Xanthomonas, 62, 94f, 96, **112**
  campestris, 112, 385f
Xenobióticos, degradación, 485
Xilanasa, 461, 462
Xilano, 460
D-Xilosa, 461f
Xilulosa-5-fosfato, 251, 293

Y

Yacimientos de azufre, 348
Yersinia, 97
  pestis, 315
Yodinina, 87
Yógeno, 74
Yogur, 309

Z

Zea mays, 35
Zeaxantina, 137
Ziehl-Neelsen, técnica, 104
Zigomicetos, 171, **178**
Zigósporas, 178
Zigoto, 19
Zimógenos, microorganismos, 474
Zooclorelas, 598
Zoogloea, 96
  ramigera, 63f, 64
Zoósporas, 170
  deslizamiento, 177
Zooxantelas, 598
Zumos de frutas, clarificación, 13
Zygosaccharomyces, 184f
Zymomonas mobilis, 301